

**Phänotypische Untersuchungen zur prognostischen
Bedeutung Proliferations- und Apoptose-assoziiierter
Faktoren sowie der Expression von Adhäsionsmolekülen in
Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des
Oropharynx**

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. med. Dr. med. dent. Christian Stoll

geboren am 23. April 1960 in Lübeck

Präsident: Prof. Dr. jur. Dr. h. c. H. Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Eingereicht am: 12. April 2000

Habilitiert am: 06. März 2001

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. E. Dielert
2. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. von Domarus

Zusammenfassung	4
Summary	6
1 Einleitung	8
1.1 Tumorinzidenz und Mortalität	8
1.2 Biologische Grundlagen der Kanzerogenese	9
1.2.1 Regulation des Zellzyklus	9
1.2.2 P53 als „Wächter des Genoms“	10
1.2.3 Inaktivierungsmechanismen von p53	11
1.2.4 Regulation der Cyclin-abhängigen-Kinasen	13
1.2.5 Das Retinoblastoma-Gen	14
1.2.6 Regulation der Apoptose	15
1.2.7 Die BCL-2 Familie	16
1.2.8 Maligne Progression	17
1.2.9 E-Cadherin	19
1.2.10 CD44	20
2 Patienten	24
2.1 Klinische Befunde und Therapieverfahren	24
2.2 Tumornachsorge	26
2.3 Pathoanatomische Befunde	28
2.3.1 Staging	28
2.3.2 Grading	30
2.3.3 Stadieneinteilung	31
2.3.4 Dysplasiegrade im Epithel	31
3 Material und Methoden	33
3.1 Histologische Präparate	33
3.2 Immunhistologische Nachweismethoden	34
3.2.1 P53	34
3.2.2 P90 ^{MDM2}	35
3.2.3 P21 ^{CIP}	35
3.2.4 P16 ^{INK4a}	35
3.2.5 Cyclin D1	36
3.2.6 PRB	36
3.2.7 BCL-2	36
3.2.8 BAX	37
3.2.9 E-Cadherin	37
3.2.10 CD44	38

3.2.11	Ki-67	39
3.3	Apoptosenachweis	40
3.4	Statistische Methoden	41
4	Ergebnisse.....	42
4.1	Immunhistologische Nachweismethoden	42
4.1.1	P53	42
4.1.2	P90 ^{MDM2}	46
4.1.3	P21 ^{CIP}	50
4.1.4	P16 ^{INK4a}	54
4.1.5	Cyclin D1	56
4.1.6	PRB	59
4.1.7	BCL-2.....	62
4.1.8	BAX.....	64
4.1.9	E-Cadherin	67
4.1.10	CD44.....	70
4.1.11	Ki-67	80
4.2	Apoptosenachweis	84
5	Diskussion	88
5.1	Klinische und kausale Aspekte der Kanzerogenese	88
5.2	Regulation von Zellzyklus und Apoptose	93
5.2.1	P53 und die assoziierten Parameter p90 ^{MDM2} und p21 ^{CIP}	93
5.2.2	PRB und assoziierte Parameter	96
5.2.3	Proliferation und Apoptose	98
5.3	Adhäsionsmoleküle	101
5.3.1	E-Cadherin	101
5.3.2	CD44.....	102
	Literaturverzeichnis	105
	Anmerkungen	122
	Lebenslauf	123

Zusammenfassung

Tumorstadium ist durch eine Störung des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Apoptose charakterisiert. Sinn des ersten Teils dieser Untersuchungen war es, die Bedeutung von Proliferations- und Apoptose-assoziierten Faktoren in primären Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx bei 107 Patienten zu beurteilen. In neun Fällen wurden auch entsprechende Lymphknotenmetastasen untersucht. Für die Ermittlung der Apoptoseraten wurde eine durch terminale Transferase katalysierte enzymatische Markierung von DNA-Fragmenten verwendet. Die Parameter p53, p90^{MDM2}, p21^{CIP}, p16^{INK4a}, Cyclin D1, pRB, BCL-2, BAX und das Proliferations-assoziierte Antigen Ki-67 wurden immunhistologisch bestimmt.

Der Tumorsuppressor p53 war in den basalen Schichten des in den Tumorpräparaten miterfaßten Epithels abhängig vom Dysplasiegrad vermehrt nachweisbar ($p < 0,01$). Eine positive Korrelation vom p53-Nachweis zum nur in höheren Zellagen zu findenden Antagonisten p90^{MDM2} ergab sich im dysplastischen und dysplasiefreien Epithel ($p < 0,05$), zum ebenfalls nur in höheren Zellagen erkennbaren Effektormolekül p21^{CIP} nur im dysplastischen Epithel ($p < 0,05$).

Im Tumorgewebe war p53 in etwa der Hälfte der Fälle immunhistologisch nachzuweisen. Positive Fälle waren dabei mit geringeren Apoptoseraten ($p < 0,003$) und einem positiven p90^{MDM2}-Nachweis ($p < 0,001$) verknüpft. Die Apoptoserate war außerdem mit dem BCL-2-Nachweis negativ und dem BAX-Nachweis positiv korreliert ($p < 0,001$). Letzterer zeigte wiederum eine reziproke Beziehung zum immunhistologisch nachweisbaren p53 ($p < 0,03$). Die Antagonisten BCL-2 und BAX wiesen dabei auch eine negative Korrelation zueinander auf ($p < 0,001$). Der BCL-2-Nachweis gelang in etwa einem Drittel der Fälle und zwar häufiger in geringer differenzierten Tumoren als in höher differenzierten Karzinomen ($p < 0,001$), was aus seiner physiologischen Aufgabe resultieren könnte, „Stammzellen“ vor der Apoptose zu bewahren. Sowohl die Proliferation ($p < 0,006$) als auch die Apoptoserate ($p < 0,03$) waren in größeren gegenüber kleineren Tumoren erhöht, auch wenn sich kein direkter Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern ergab. Außerdem war in größeren Tumoren vermehrt pRB zu finden ($p < 0,002$), das wiederum eine positive Korrelation zur Proliferationsaktivität ($p < 0,001$) und zu p53 ($p < 0,05$) zeigte. Der Phosphorylierungsgrad von pRB wird im Zellzyklus unter anderem durch die Konzentration an Cyclin D1 bestimmt, das in metastasierenden Tumoren häufiger zu finden war als in solchen ohne Lymphknotenmetastasen ($p < 0,001$).

In bis zu 29% der 31 Fälle, in denen mehrere verschiedene Blöcke identischer Primärtumoren miteinander verglichen werden konnten, ergaben sich Differenzen zwischen diesen bei der Bestimmung der hier untersuchten Parameter als Zeichen einer intratumoralen Heterogenität, die die Bedeutung der Feldkanzerisierung für diese Tumorentität unterstreicht. Auch zu den entsprechenden Lymphknotenmetastasen wurden vereinzelt Unterschiede gefunden, die aber keine Systematik im Sinne einer Expressionsänderung dieser Parameter im Laufe des Metastasierungsprozesses erkennen ließen. Im Gegensatz zum konventionellen Tumor-Grading und -Staging zeigte keiner der in diesem Teil der Arbeit bestimmten Parameter einen signifikanten Einfluß auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten mit manifesten Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx. Lediglich ein positiver BAX-Nachweis und eine hohe Proliferationsrate hatten tendenziell einen negativen Einfluß auf die Prognose. Während einer Expressionsänderung dieser Faktoren also eher eine Relevanz in frühen Stadien der Kanzerogenese zukommt, könnten im Rahmen der Progression von manifesten Tumoren vielmehr andere Faktoren wie Adhäsionsmoleküle eine prognostische Bedeutung besitzen, die im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht wurden.

Beim immunhistologischen Nachweis von E-Cadherin war im Epithel außerhalb der Plattenepithelkarzinome ausnahmslos eine membranöse Färbung der Zellen im Stratum spinosum und granulosum erkennbar. Im Tumorgewebe war diese Färbung keineswegs immer auf die Zellmembran beschränkt. In 20,9% ergab sich im Zytoplasma eine vergleichbare Färbung und in 14,3% überlagerte sogar die zytoplasmatische Färbungsintensität. Eine prognostisch negative, wenn auch nicht signifikante Bedeutung für das Überleben und Rezidiv-freie Überleben hatte aber nur der in 15,4% der Fälle gefundene vollständige Verlust der E-Cadherin-Expression im Tumorgewebe.

Auch die durch die varianten Exons V4, V5, V6, V7 und V9 kodierten und durch alternatives Spleißen der prä-mRNA nur bei bestimmten Isoformen des Adhäsionsmoleküls CD44 exprimierten Polypeptidabschnitte konnten mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern im gesamten Epithel außerhalb der Plattenepithelkarzinome nachgewiesen werden. Im Tumorge-

webe war eine Expressionsminderung gegenüber dem Epithel für die Isoformen CD44v4, CD44v5 und CD44v6 nur in einzelnen Fällen von gering differenzierten Karzinomen zu finden. CD44v7 und CD44v9 waren in 13,2% und 34,1% der Fälle häufiger vermindert. Diese Expressionsminderungen zeigten einen signifikant negativen Einfluß sowohl auf das Überleben als auch auf das Rezidiv-freie Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier (CD44v7: $p < 0,05$; CD44v9: $p < 0,02$). Die Expressionsminderung von CD44v9 war dabei signifikant mit einem höheren Tumor-Grading verknüpft ($p < 0,001$). Eine Verminderung der Expression von mindestens einer der hier untersuchten CD44-Isoformen im Tumorgewebe gegenüber dem Epithel war in insgesamt 39,4% der Fälle zu finden, in denen das Überleben ($p < 0,002$) und Rezidiv-freie Überleben ($p < 0,005$) der Patienten nach Kaplan und Meier signifikant gegenüber den übrigen Patienten verkürzt war. In einer multivariaten Analyse des Überlebens nach Cox unter Ein-schluß der Parameter Tumorgröße und -infiltration pT, Lymphknotenmetastasierung pN, histo-logisches Tumor-Grading G und Verminderung der Expression von mindestens einer der hier untersuchten CD44-Isoformen im Tumorgewebe waren nur pT (Wald-Statistik: $W = 5,24$; $p < 0,03$), pN ($W = 9,48$; $p < 0,003$) und die Bestimmung der Expression der CD44-Isoformen ($W = 9,67$; $p < 0,002$) unabhängige Prognosefaktoren. Für das Rezidiv-freie Überleben hatten in diesem Modell nur die Lymphknotenmetastasierung pN ($W = 4,72$; $p < 0,03$) und die CD44-Ex-pression ($W = 6,14$; $p < 0,02$) unabhängige prognostische Bedeutung. Somit stellen in diesem Tumorkollektiv Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen gegenüber dem Epithel prognostisch bedeutsame Ereignisse im Verlauf der Tu-morprogression dar.

Schlüsselwörter: Plattenepithelkarzinom, Prognose, Apoptose, Adhäsionsmoleküle

Summary

Tumour growth is characterized by an imbalance between cell proliferation and apoptosis. The aim of the first part of this study was to estimate the importance of proliferation- and apoptosis-associated factors in primary squamous cell carcinomas of the oral cavity and the oropharynx obtained from 107 patients. In nine cases also corresponding lymph node metastases were examined. DNA-fragments were marked enzymatically catalysed by a terminal transferase reaction for the recognition of apoptosis. The parameters p53, p90^{MDM2}, p21^{CIP}, p16^{INK4a}, cyclin D1, pRB, BCL-2, BAX, and the proliferation-associated antigen Ki-67 were determined immunohistochemically.

The tumour suppressor p53 was mainly detectable in the basal cell layers of the epithelium included in the tumour specimens additionally depending on the grade of dysplasia ($p < 0.01$). A positive correlation of p53 to its antagonist p90^{MDM2}, recognizable only in higher cellular layers, was found in the dysplastic and non-dysplastic epithelium ($p < 0.05$), to the effector molecule p21^{CIP}, limited to the higher cellular layers as well, only in the dysplastic epithelium ($p < 0.05$).

P53 was recognized immunohistochemically in about half of the cases of tumour tissue. Positive cases were associated with lower apoptosis ($p < 0.003$) and a positive p90^{MDM2}-detection ($p < 0.001$). In addition, apoptosis was correlated negatively with BCL-2- and positively with BAX-measurements ($p < 0.001$). Latter one showed in turn a reciprocal relationship to the immunohistochemically provable p53 ($p < 0.03$). The antagonists BCL-2 and BAX demonstrated a negative correlation to each other ($p < 0.001$). The detection of BCL-2 succeeded in approximately a third of all cases and more frequently indeed in less well-differentiated tumours than in more well-differentiated carcinomas ($p < 0.001$), what might correspond to its physiological function of preserving stem cells from apoptosis. Both proliferation ($p < 0.006$) and apoptosis ($p < 0.03$) were increased in larger tumours even if no direct connection between these two parameters resulted. In addition, pRB was predominately found in larger tumours ($p < 0.002$) and showed a positive correlation to the proliferation activity ($p < 0.001$) and to p53 ($p < 0.05$). The grade of pRB-phosphorylation in the cell cycle depends on the concentration of cyclin D1 which was found more frequently in metastasizing tumours than in such without lymph node metastases ($p < 0.001$).

A variance among these results was detectable in up to 29% of the 31 cases in which several distinct blocks of identical primary tumours could be compared with each other as a signs of an intratumoural heterogeneity which underlines the importance of a multifocal cancerogenesis for this tumour entity. Additionally differences to the corresponding lymph node metastases were found which would not let recognize any systematics, however, in the sense of a changed expression of these parameters in the course of the metastatic spread. Unlike the conventional tumour-grading and -staging none of the parameters tested in this part of the study showed a significant influence on the survival and recurrence-free survival of the patients with apparent squamous cell carcinomas of the oral cavity and the oropharynx. Only a positive BAX-determination and a high proliferation rate had tendentially a negative influence on prognosis. While a relevancy is therefore rather coming up to a changed expression of these factors in early stages of the cancerogenesis, other factors as adhesion molecules could have a prognostic importance that were examined in the second part of this study within the framework of the progression of manifest tumours.

By the immunohistochemical detection of E-cadherin a membranous staining of the cells was recognizable without exception in the prickle-cell and granular layers of the epithelium outside of the squamous cell carcinomas. In the tumour tissue this staining was not always limited to the cell membranes. A comparable staining was found in 20.9% of the cases in the cytoplasm and in 14.3% even the cytoplasmic staining intensity predominated. A prognostically negative, but not significant importance for the survival and recurrence-free survival had, however, only the complete loss the E-cadherin expression in the tumour tissue discovered in 15.4% of the cases.

Similarly, the polypeptide sections coded by the various exons V4, V5, V6, V7, and V9 and expressed after alternative splicing of the pre-mRNA only in specific isoforms of the adhesion molecule CD44 were verified in the entire epithelium outside of the squamous cell carcinomas by means of specific monoclonal antibodies. In the tumour tissue a reduced expression of the isoforms CD44v4, CD44v5, and CD44v6 compared with the epithelium was found only in individual cases of less well-differentiated carcinomas. CD44v7 and CD44v9 were decreased more frequently in 13,2% and 34,1% of the cases. This diminished expression showed a significantly

negative influence both on the survival and the recurrence-free survival of the patients according to Kaplan and Meier (CD44v7: $p < 0.05$; CD44v9: $p < 0.02$). The decreased expression of CD44v9 was associated with a higher tumour-grading significantly ($p < 0.001$). A diminution of the expression of at least one or more of the here examined CD44 isoforms in the tumour tissue compared with the epithelium was provable in 39,4% of all cases, in which the survival ($p < 0.002$) and recurrence-free survival ($p < 0.005$) of the patients according to Kaplan and Meier was reduced significantly as against the other patients. In a multivariate analysis of the survival according to Cox under inclusion of the parameters tumour-size and -infiltration as pT, formation of lymph node metastases as pN, histopathological tumour-grading as G, and a decrease of the expression of at least one of the here examined CD44 isoforms in the tumour tissue only pT (Wald-statistics: $W = 5.24$; $p < 0.03$), pN ($W = 9.48$; $p < 0.003$), and the expression of the CD44 isoforms ($W = 9.67$; $p < 0.002$) were independent prognostic factors. For the recurrence-free survival only the lymphatic spread as pN ($W = 4.72$; $p < 0.03$) and the CD44 expression ($W = 6.14$; $p < 0.02$) showed an independent prognostic importance in this model. Thus, alterations of the expression of adhesion molecules on the surface of tumour cells compared with the epithelium represent prognostically important events during the tumour progression in this collective.

Key words: squamous cell carcinoma, prognosis, apoptosis, adhesion molecules

1 Einleitung

1.1 Tumorinzidenz und Mortalität

Im Jahre 1997 wurden in der Bundesrepublik Deutschland 860389 Sterbefälle (398317 Männer, 462072 Frauen) in die Todesursachenstatistik aufgenommen [249]. Die häufigsten Todesursachen waren Erkrankungen des Kreislaufsystems (415892 Todesfälle = 48,3%), wobei die Mehrzahl der betroffenen Menschen älter als 75 Jahre war (295083 Todesfälle = 71,0%). An zweiter Stelle rangierten die bösartigen Neubildungen (210090 Todesfälle = 24,4%, 107618 Männer = 27,0%, 102472 Frauen = 22,2%). Der Anteil von über 75 jährigen Patienten bei den an bösartigen Neubildungen Verstorbenen war dabei deutlich geringer (87649 Todesfälle = 41,7%) als bei den Erkrankungen des Kreislaufsystems.

Unter den häufigsten Krebsneuerkrankungen nahmen nach einer Schätzung des Robert-Koch-Instituts im Jahre 1997 die Tumoren der Mundhöhle und des Rachens (ICD-9 140-149) [29] mit einem Anteil von 2,9% zwar nur den neunten Rang ein [217], die Inzidenz zeigte aber zumindest bis 1993 einen stetigen Anstieg [15, 70]. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Verhältnis 2,9:1) [217]. Das Plattenepithelkarzinom (ICD-O 8070/3 und 8071/3) [296] ist hier die am häufigsten diagnostizierte Tumorentität (Abb. 1) [20, 174, 210], wobei sich der Altersgipfel mit steigender Inzidenz von der 7. in die 6. Lebensaltersdekade vorverschoben hat. Trotz weiterentwickelter diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten konnte die Überlebensrate der davon betroffenen Patienten bisher nicht entscheidend verlängert werden [20]. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Männern in der Bundesrepublik Deutschland derzeit 43%, bei Frauen 56% [217]. Gemessen an der Lebenserwartung gehen in Deutschland jährlich durch den Tod an bösartigen Tumoren der Mundhöhle und des Oropharynx bei Männern insgesamt etwa 72200 und bei Frauen etwa 17500 Lebensjahre verloren. Der durchschnittliche Verlust an Lebenserwartung beläuft sich für Männer dabei auf 10-15 Jahre und für Frauen auf 10-11 Jahre. Das Wissen um die biologischen Veränderungen und prognostischen Faktoren während der Tumorentstehung und -progression stellt letztlich die Basis für eine gezielte Prävention, Entwicklung und Auswahl adäquater Therapiestrategien und Voraussage der Prognose für den Patienten dar.

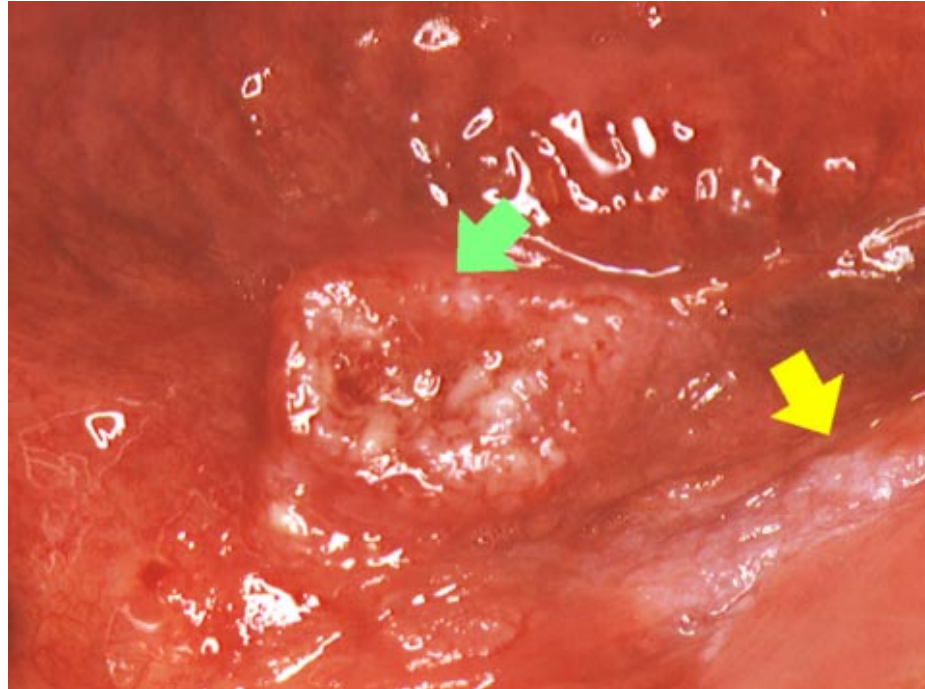


Abb. 1: Plattenepithelkarzinom im Mundbodenbereich. Neben dem teilweise exophytischen, exulzerierten Tumor (Grüner Pfeil) erkennt man ein leukoplakisches Areal in unmittelbarer Nähe dazu (Gelber Pfeil).

1.2 Biologische Grundlagen der Kanzerogenese

1.2.1 Regulation des Zellzyklus

Neoplastische Erkrankungen sind durch eine Störung des Gleichgewichts zwischen der Zellvermehrung durch Zellteilung und dem natürlichen Absterben von Zellen, der Apoptose oder dem programmierten Zelltod, charakterisiert [130, 215, 292]. Dabei kann Tumorwachstum aus abnorm gesteigerter, autonomer Proliferation und/oder Inhibition des normalen Zellverlustes durch Apoptose resultieren. Die zelluläre Proliferation folgt den einzelnen Schritten des Zellzyklus (Abb. 2), der bei somatischen Zellen zunächst in die Mitose und die Interphase eingeteilt werden kann [66]. Die Mitose ist dabei in den einzelnen Schritten der Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase am besten morphologisch zu beurteilen, stellt aber mit einer Dauer von etwa 30 min den kürzesten Abschnitt im Zellzyklus dar [44]. Die Zählung der Mitoserate ist der „klassische“ Ansatz zur Bestimmung der Proliferationsaktivität in Tumoren und spielt neben strukturellen und zytologischen Parametern auch für das Tumor-Grading eine Rolle [156, 210].

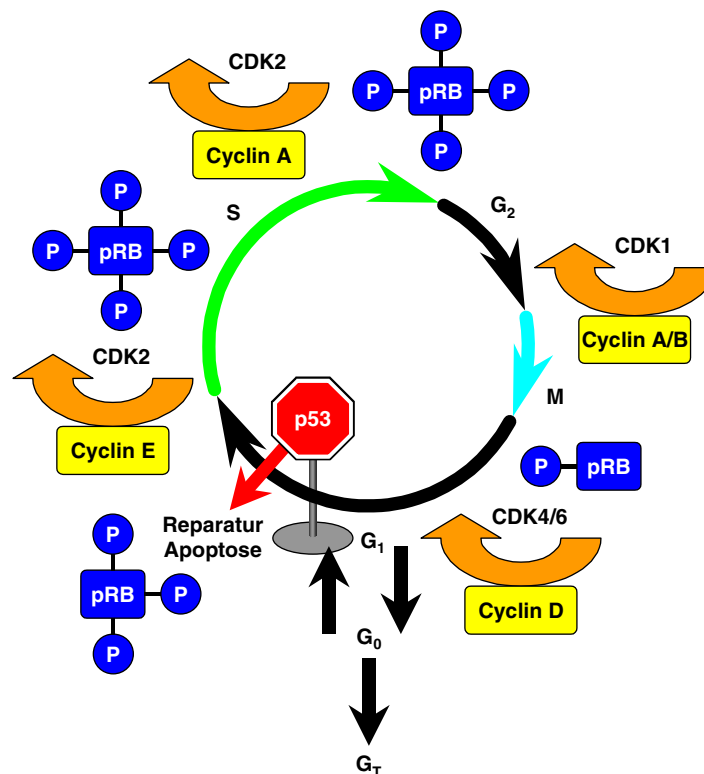


Abb. 2: Der Zellzyklus wird in den einzelnen Phasen der Mitose (M) und Interphase (G₁, S, G₂) durch Cycline und Cyclin-abhängige-Kinasen (CDK) gesteuert. Im Verlauf der Interphase wird das Retinoblastoma-Gen-Protein (pRB) durch die CDK phosphoryliert (P). Als Alternative zum Verbleib im Zellzyklus können die Zellen in die G₀-Phase und weiter in die Phase der terminalen Differenzierung (G_T) eintreten, aus der ein Wiedereintritt in den Zellzyklus nicht möglich ist. Am Ende der G₁-Phase vor Eintritt in die S-Phase befindet sich der Kontrollpunkt von p53, wo bei im Genom geschädigten Zellen der Zellzyklus solange gestoppt wird, bis der genetische Schaden repariert ist oder die Zellen der Apoptose anheimfallen.

In der postmitotischen G₁-Phase (gap1-phase) vollziehen sich nach der Zellteilung zunächst die Rekonstruktion der Zellproteine für das Wiedererreichen der ursprünglichen Zellgröße und -funktion sowie die Vermehrung der Zellorganellen [66]. Die Dauer der G₁-Phase variiert bei verschiedenen Zellarten beträchtlich und beträgt im Stratum basale des Mundschleimhautepithels etwa 10 bis 13 Tage, was durch tierexperimentelle Untersuchungen mit Tritium-markiertem ³H-Thymidin radioautographisch bestimmt werden konnte [257]. In der ungefähr 6 h dauernden S-Phase (Synthese-Phase) findet anschließend die Synthese der Desoxyribonukleinsäuren (DNA) statt. Es folgt die etwa 6 h lange prämitotische Ruhephase G₂ (gap2-phase). Nicht-neoplastische Zellen weisen in der G₁-Phase einen diploiden DNA-Gehalt auf. In der S-Phase nimmt der DNA-Gehalt bis zur Tetraploidie zu, die in der G₂-Phase erreicht ist und während der Mitose bis zur Zytokinese erhalten bleibt. Dies bildet die Grundlage der DNA-zytometrischen Analyse des

Zellzyklus [6, 8, 92, 172]. Alternativ können die Zellen nach der Mitose in die G_0 -Phase eintreten (Abb. 2), in der keine Zellteilungsvorgänge stattfinden, aus der heraus jedoch eine Rückkehr in den Zellzyklus möglich ist. Nach Eintritt in die terminale Differenzierungsphase G_T ist eine weitere Zellteilung nicht mehr möglich [66].

Eine andere Möglichkeit zur Beurteilung der Proliferationsaktivität neben der Zählung der Mitoserate beruht auf der Bestimmung von Antigenen, die nur in bestimmten Phasen innerhalb des Zellzyklus exprimiert werden. So ist das nukleäre Antigen Ki-67, das in zwei Formen mit 395 kD und 345 kD vorkommt, nur während der G_1 -, S- und G_2 -Phase des Zellzyklus, nicht aber während der G_0 - und G_T -Phase nachweisbar [74]. Für die Beurteilung der Proliferationsaktivität von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle hatte es sich in früheren Untersuchungen als zuverlässiger Parameter im Vergleich zum PCNA (proliferating cell nuclear antigen), einer Untereinheit der DNA-Polymerase δ , erwiesen [197].

Der Ablauf des Zellzyklus wird durch Proteinkomplexe kontrolliert, die aus Cyclinen und Cyclin-abhängigen-Kinasen (CDK = cyclin dependent kinase) bestehen [66]. Diese Komplexe üben ihre regulatorische Funktion aus, indem sie weitere Schlüsselproteine wie das durch das Retinoblastoma-Gen kodierte Phosphoprotein (pRB) phosphorylieren, die in den weiteren Fortgang des Zellzyklus involviert sind (Abb. 2) [27, 36, 44, 50, 88, 92, 195, 234].

1.2.2 P53 als „Wächter des Genoms“

Am Ende der G_1 -Phase vor Eintritt in die S-Phase befindet sich ein Kontrollpunkt des Tumorsuppressors p53, wo der Zellzyklus von im Genom geschädigten Zellen solange gestoppt wird, bis der Schaden repariert ist oder die Apoptose der Zelle eingeleitet wird (Abb. 2) [44, 62, 125, 143, 230]. P53 ist auch an einem weiteren Kontrollpunkt am Ende der G_2 -Phase vor Eintritt in die Mitose beteiligt [30]. Das p53 scheint im Zellzyklus von ungeschädigten Zellen keine lebensnotwendige Funktion zu besitzen, da Mäuse, die aufgrund eines genetischen Defektes kein funktionsfähiges p53 in ihren Zellen ausbilden, zunächst keine Entwicklungsstörungen zeigen [54]. Im Laufe ihres Lebens entwickeln sie aber gehäuft verschiedene Tumoren, wie das auch beim Menschen im Rahmen des seltenen, autosomal dominant vererbten Li-Fraumeni-Syndroms, einem Syndrom mit hereditären p53-Mutationen, zu beobachten ist [155, 162]. Das Wildtyp-p53 übt somit offenbar die Funktion eines „Wächters des Genoms“ aus [143]. Es sichert die Integrität des Genoms, indem ein genetischer Schaden nicht durch Zellteilung auf Tochterzellen weitergegeben werden kann.

P53 ist ein unter physiologischen Bedingungen aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von maximal 20 Minuten in nur geringer Konzentration im Zellkern lokalisiertes Phosphoprotein mit einer Molekülmasse von 53 kD und besteht aus 393 Aminosäuren (Abb. 3) [154]. Das 20303 Basenpaare große TP53-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 bei 17p13.1 und setzt sich aus 11 Exons, von denen das erste gar nicht und das zweite und elfte nur teilweise kodieren, und den entsprechenden Introns zusammen [44, 133, 154]. Es sind zwei Promotoren für das TP53-Gen bekannt: Der erste befindet sich vor dem ersten, nicht kodierenden Exon; der zweite, wirkungsvollere ist etwa 1000 Basenpaare hinter dem ersten Exon im ersten, 10738 Basenpaare großen Intron lokalisiert [216]. Das p53 formt über seine C-terminal gelegene Oligomerisierungsdomäne stabile Tetramere [116, 251] und aktiviert durch Bindung seiner spezifischen DNA-Bindungsstelle an die entsprechenden DNA-Abschnitte durch seine N-terminale Transaktivierungsdomäne die Transkription von Zielgenen (Abb. 3 und Abb. 4) [38, 281]. Lineare DNA-Einzel- oder Doppelstränge und zirkuläre DNA-Einzelstränge sowie zirkuläre Doppelstränge mit einer Lücke von mindestens 2900 Basen in einem Strang binden direkt an die C-terminale unspezifische DNA-Bindungsdomäne [107]. Nach Einwirkung von genotoxischen Einflüssen auf die Zelle steigt die Konzentration von p53 im Zellkern durch Stabilisierung der Tetramere an [125]. Diese Stabilisierung ist auf eine Konformationsänderung zurückzuführen, die durch posttranslatorische Einflüsse wie die Phosphorylierung von Serinresten im p53-Phosphoprotein ausgelöst wird (Abb. 3) [236].

In der Aminosäuresequenz von p53 finden sich fünf im Verlauf der Vertebraten-Evolution hochkonservierte Abschnitte (Abb. 3) [133, 203]. Die Abschnitte II bis V (Aminosäuren 129-146, 171-179, 234-260 und 270-287) liegen in der spezifischen DNA-Bindungsdomäne. Mutationen, die in menschlichen Tumoren gefunden werden, betreffen fast ausschließlich diese Region [82, 100, 154, 203, 282]. Die Struktur des Aminosäurenabschnitts V, die einem Faltblatt-Schleifen-Helix-Motiv entspricht, bindet an Basen in der großen Furche der DNA [38]. Die Struktur der Abschnitte II und III entspricht jeweils einer Schleifenform, die durch ein Zink-Atom stabilisiert wird.

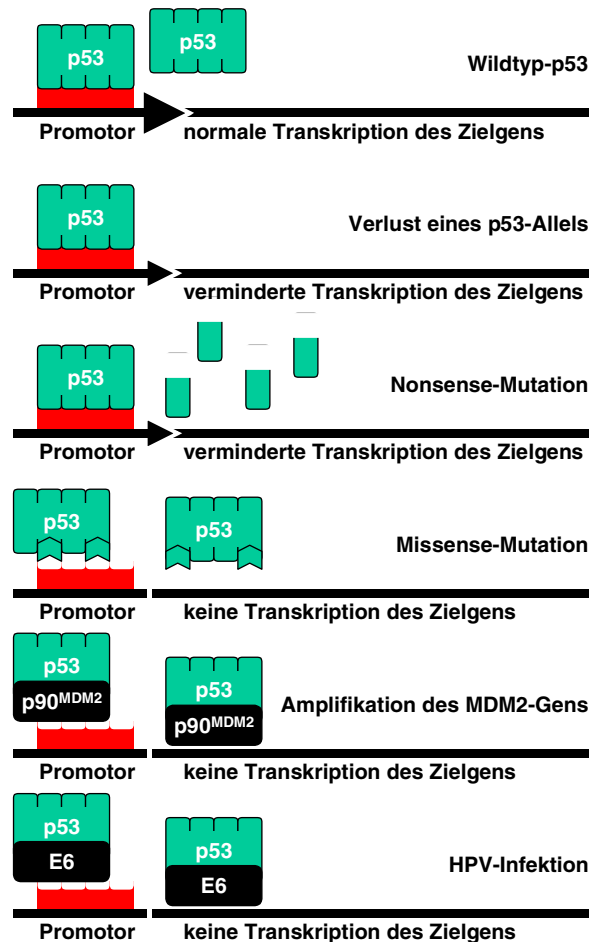


Abb. 4: Das p53 formt über seine Oligomerisierungs-domäne stabile Tetramere und aktiviert durch Bindung seiner sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne an die entsprechenden DNA-Abschnitte (Promotor) die Transkription von Zielgenen. Bei Verlust von p53-Allelen oder Nonsense-Mutationen, die ein trunkiertes p53-Phosphoprotein zur Folge haben, das nicht in der Lage zur Tetramerisierung und Transaktivierung ist, kommt es zu einer verminderten oder fehlenden Transkription der Zielgene. Eine Missense-Mutation führt über den Einbau von veränderten p53-Monomeren in die dann in der Gesamtkonformation veränderten Tetramere ebenfalls zu einer fehlenden Transkriptionsaktivierung. Auch eine Bindung von zellulären Proteinen wie p90^{MDM2} und viralen Proteinen wie E6 aus den humanen Papillomaviren 16 und 18 hemmt die Transaktivierungsfunktion.

Darüber hinaus kann p53 durch Bildung von Komplexen mit Proteinen wie dem zellulären Phosphoprotein p90^{MDM2}, das im Bereich der Transaktivierungsdomäne bindet, funktionell inaktiviert werden (Abb. 3 und Abb. 4) [7, 181, 198, 281]. Ferner vermittelt p90^{MDM2} die Proteolyse von p53 durch Proteasen des Ubiquitin-Systems. Insgesamt ergibt sich durch den negativen Rückkopplungsmechanismus, in dem p53 einerseits die Synthese von p90^{MDM2} induziert [7], andererseits nach Bindung von p90^{MDM2} abgebaut wird (Abb. 5), unter physiologischen Bedingungen eine niedrige zelluläre p53-Konzentration [154, 297]. P90^{MDM2} ist ein Phosphoprotein mit einem Zink-Finger-Motiv und einer Molekülmasse von etwa 90 kD aus bis zu 491 Aminosäuren und kommt in mindestens vier verschiedenen Formen vor [7, 181, 198, 230]. Das kodierende Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 12 auf dem Locus 12q14.3-q15 lokalisiert [178] und erstmals im Mausmodell (BALB/c) als ein mehr als 50-fach amplifiziertes Onkogen in einer tumorinduzierenden Fibroblasten-Zelllinie (3T3DM), die ein doppeltes Chromatidfragment (minute) als zytogenetisches Zeichen einer Genamplifikation enthält, entdeckt und als murine-double-minute-2-Gen (MDM2) bezeichnet worden [63].

Virale Proteine wie das E6-Protein (early 6) der humanen Papilloma-Viren 16 und 18 [177, 288], das E1B-55-kD-Protein (early region 1B) des Adenovirus, Typ 5 [222] und das große T-Antigen (large tumor antigen) des SV40-Papovavirus (simian virus 40) mit seinen Aminosäuren 400-650 [144, 222] haben ebenfalls spezifische Bindungsstellen im p53-Phosphoprotein (Abb. 3), wobei

die Bindung des E6-Proteins an die C-terminale Domäne eine Ubiquitin-abhängige Degradation des Moleküls induziert [224]. Dagegen führt eine Bindung des E1B-55-kD-Proteins und des großen T-Antigens zu einer Stabilisierung des p53-Moleküls bei gleichzeitigem Funktionsverlust durch Blockierung der jeweiligen Domänen (Abb. 4) [79, 87, 233, 281].

1.2.4 Regulation der Cyclin-abhängigen-Kinasen

Das physiologische Effektormolekül des Wildtyp-p53 in der Kaskade des Zellzyklus ist das p21^{CIP} (Abb. 5), ein Protein mit einer Molekülmasse von 21 kD aus 164 Aminosäuren, das auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 auf dem Locus 6p21.2 kodiert ist [30, 44, 59, 230]. 2400 Basenpaare vor diesem Gen befindet sich der zugehörige Promotor, der eine Bindungsstelle für p53 enthält (Abb. 4). Mutationen treten im p21^{CIP} extrem selten auf [44, 230]. Das p21^{CIP} wird gemäß seiner Funktionen neben WAF1 (wild-type p53 activated fragment 1) [59] und SD11 (senescent cell derived inhibitor 1) [193] als auch als CIP1 (CDK interacting protein 1) [90] bezeichnet. Das p21^{CIP} übt nämlich einen inhibierenden Einfluß auf Cyclin-abhängige-Kinasen aus (Abb. 5) [30, 90, 301, 306].

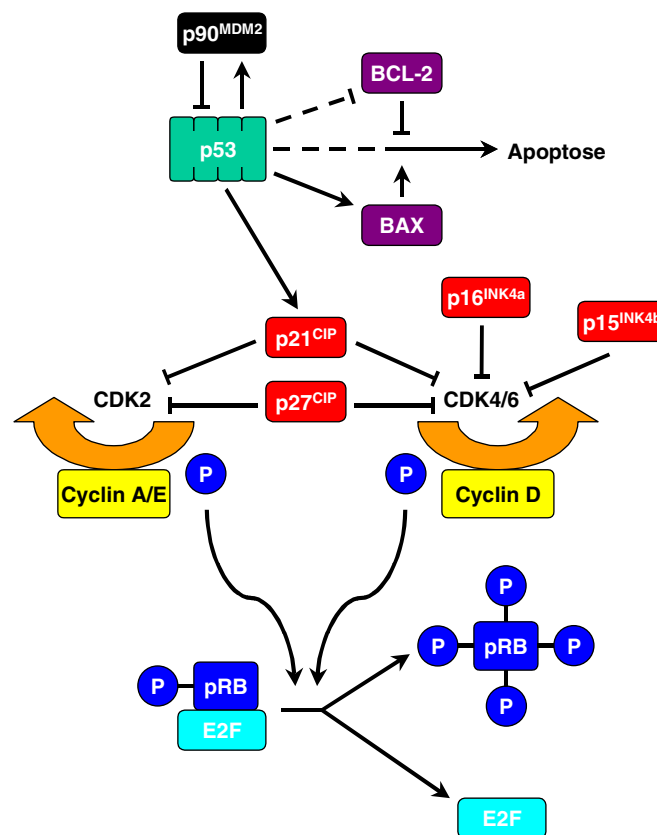


Abb. 5: Das p53 bildet mit dem p90^{MDM2} einen negativen Rückkopplungsmechanismus, in dem p53 einerseits die Synthese von p90^{MDM2} induziert, andererseits nach Bindung an p90^{MDM2} Ubiquitin-abhängig abgebaut wird. Durch Induktion von p21^{CIP} werden die Cyclin-abhängigen-Kinasen 2, 4 und 6 (CDK2/4/6) inhibiert, die durch Cycline gesteuert über eine Phosphorylierung (P) des Retinoblastoma-Gen-Phosphoproteins pRB für eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F sorgen. Weitere Inhibitoren für CDK2/4/6 sind p27^{CIP} und für CDK4/6 p16^{INK4a} und p15^{INK4b}. P53 induziert weiterhin BAX, das die Apoptose fördert, und hemmt indirekt die Synthese von BCL-2, das die p53-abhängige Apoptose verhindert.

Ein weiterer Inhibitor der Cyclin-abhängigen-Kinasen 4 und 6 ist das p16^{INK4a} (polypeptide inhibitor of CDK4 and CDK6) (Abb. 5), das durch ein Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 auf dem Locus 9p21 mit zwei alternativen Leserahmen kodiert wird [122, 231, 307]. Das zweite Genprodukt p14^{ARF} (alternate reading frame, p19^{ARF} im Mausmodell) besitzt keine strukturelle Ähnlichkeit zu p16^{INK4a} und blockiert die Wirkung von p90^{MDM2} [256, 308]. Gesteuert von zwei unterschiedlichen Promotoren werden auf dem INK4a/ARF-Locus zwei verschiedene Exons 1-α (125 Basenpaare) für p16^{INK4a} und 1-β für p14^{ARF} gefolgt von den beiden gemeinsamen Exons

transkribiert und verspleißt [212]. Die Translation der genetischen Sequenz der beiden gemeinsamen Exons 2 (307 Basenpaare) und 3 (12 Basenpaare) erfolgt anschließend in zwei zueinander verschobenen Leserahmen [213]. Im INK4a/ARF-Locus wurden bei menschlichen Tumoren je nach Tumorentität Deletionen oder Punktmutationen beschrieben [122, 192]. Eine Hemmung der Transkription durch Methylierung des Promotors von p16^{INK4a} stellt bei fehlenden Mutationen jedoch häufig das pathogene Prinzip dar [32, 157, 173].

Die katalytischen Einheiten der Cyclin-abhängigen-Kinasen sind nur dann aktiv, wenn sie mit regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen, assoziiert sind (Abb. 2 und Abb. 5) [44, 66, 92]. Die Cyclin-abhängigen-Kinasen 4 und 6 werden durch die Cycline D1, D2 und D3 aktiviert. Mit Ausnahme dieser Cycline sind Cycline nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus vorhanden und werden im weiteren Verlauf durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse rasch abgebaut (Abb. 2); die regulatorische Bedeutung von Cyclin D ist aber auf die G₁-Phase beschränkt. Eine Überexpression des 36 kD Proteins Cyclin D1 wurde in Adenomen der Parathyroidea gefunden, wobei das für Cyclin D1 kodierende und auf dem Locus 11q13 gelegene, hier zunächst als PRAD-1 bezeichnete Gen CCND1 infolge einer Inversion in Chromosom 11 (p15;q13) durch den Parathormon-Gen-Promotor aktiviert wird [4]. Die Überexpression von Cyclin D1 in zentrozytischen B-Zell-Lymphomen ist auf eine Translokation t(11;14)(q13;q32) zurückzuführen, durch welche das CCND1- oder hier zunächst als BCL-1 (B-cell lymphoma-1) bezeichnete Gen unter den Einfluß des Immunglobulin-Schwerketten-Enhancers kommt [17, 37]. In verschiedenen weiteren Tumoren ist die Cyclin D1-Expression durch Amplifikation der 11q13-Region verstärkt [218].

1.2.5 Das Retinoblastoma-Gen

Durch die Cyclin-abhängigen-Kinasen wird im Verlauf der Interphase des Zellzyklus ein nukleäres Phosphoprotein (pRB) aus 928 Aminosäuren mit der Molekülmasse von 105 kD an Serin- und Threoninresten phosphoryliert (Abb. 2 und Abb. 5) [27, 36, 44, 50, 88, 92, 195, 234], für das das etwa 200000 Basenpaare große Retinoblastoma-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 13 auf dem Locus 13q14.1-q14.2 mit seinen 27 Exons kodiert [68, 101, 149, 284, 287]. Das Retinoblastoma-Gen ist das erste Tumorsuppressorgen, welches beim Menschen beschrieben wurde [132]. Neben dem 105-kD-Phosphoprotein sind noch Varianten mit Molekülmassen von 107 kD und 130 kD bekannt. Das pRB besitzt verschiedene, funktionell bedeutende Domänen. Die N-terminale Domäne vermittelt eine Oligomerisation von pRB. Weiter C-terminal folgt die sogenannte pRB-Tasche, die aus zwei durch eine kurze Aminosäuresequenz getrennten A- und B-Subdomänen besteht. Weiter C-terminal ist die C-Domäne lokalisiert, an die sich eine nukleäre Lokalisationssequenz anschließt. Am C-Terminus findet sich eine Konsensussequenz zur Spaltung von Caspasen [284]. Ein Teil der Phosphorylierungsstellen des pRB liegt in Motiven, die für Substrate von Cyclin-abhängigen-Kinasen typisch sind. Die Phosphorylierung von pRB wird vom Ende der Interphase bis zur Mitose beibehalten, in deren Verlauf pRB dann durch eine Phosphatase dephosphoryliert wird. In der G₀- und zu Beginn der G₁-Phase liegt pRB dann in seiner hypophosphorylierten Form vor (Abb. 2) [27, 36, 50].

Die Transaktivierung von Genen, die von den Transkriptionsfaktoren E2F1-3 abhängen, wird blockiert, wenn die Faktoren im Komplex mit der gering phosphorylierten Form des pRB vorliegen (Abb. 5) [159, 307]. Durch Phosphorylierung wird die Interaktion von pRB mit zellulären Bindungsproteinen wie E2F aufgehoben, das erstmals als Transkriptionsfaktor mit einer Molekülmasse von 60 kD durch seine transaktivierende Funktion am E2-Promotor bei Adenoviren identifiziert wurde [137]. Als mögliche Mechanismen der Transkriptionshemmung werden eine Maskierung der Transaktivierungsdomäne von E2F und die Deacetylierung von Histonen diskutiert [25, 51, 161]. Durch Acetylierung und Deacetylierung von Histonen wird die Struktur des Chromatins reguliert. Die negativ geladenen Acetylreste der Histone lockern die Chromatinstruktur auf, wodurch der Zugang von Transkriptionsfaktoren zu den entsprechenden Bindungssequenzen der DNA erleichtert wird. Eine Deacetylierung führt umgekehrt zu einer engeren Assoziation von DNA und Nukleosomen und damit zu einer Behinderung des Zugangs von Transkriptionsfaktoren. Weiterhin wird diskutiert, daß die Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch Acetylierung direkt beeinflusst werden kann [51]. E2F-gebundenes pRB assoziiert mit einer Histon-Deacetylase (HDAC1), die im Komplex mit pRB und E2F enzymatisch aktiv ist [159]. Auf diese Weise könnte die Bindung von kooperierenden Transkriptionsfaktoren an benachbarte DNA-Bindungselemente und damit die transaktivierende Wirkung von E2F blockiert werden. Durch Bindung der HDAC1 an pRB wird außerdem der Promotor des Cyclin-E-Gens reprimiert [51].

Eine Deletion von Retinoblastoma-Genen und eine damit verbundene verminderte oder fehlende Expression des Genprodukts pRB wurde außer beim Retinoblastom [42, 68, 303] auch in Weichteil- und Knochensarkomen [68], im kleinzelligen Bronchialkarzinom [303] und in Blasenkarzinomen [103] in mehr als einem Drittel aller Tumoren gefunden. Weiterhin kann die Expression durch Mutation und Hypermethylierung in der Promotorregion gestört sein [24, 158]. Analog zu p53 kann das pRB durch Bindung des zellulären Phosphoproteins p90^{MDM2} an dessen C-terminale Domäne, wodurch die Konformation im Bereich der pRB-Tasche geändert wird [299], und von viralen Proteinen wie dem E7-Protein (early 7) der humanen Papilloma-Viren 16 und 18 [57, 104], dem E1A-Protein (early region 1A) des Adenovirus, Typ 5 [290] und dem großen T-Antigen (large tumor antigen) des SV40-Papovavirus mit seinen Aminosäuren 105-114 [49] funktionell inaktiviert werden [44, 294].

1.2.6 Regulation der Apoptose

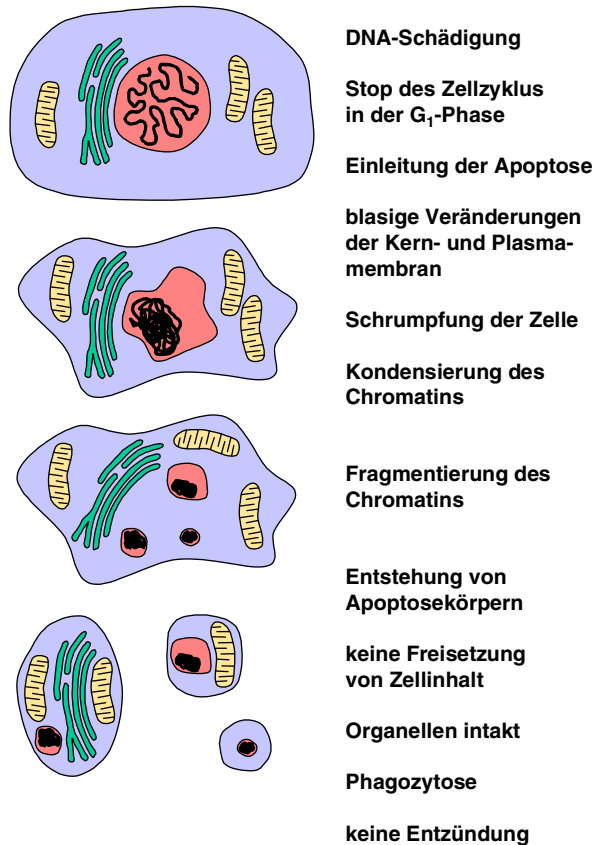


Abb. 6: Morphologische Veränderungen im Verlauf der Apoptose: blasige Veränderung der Plasma- und Kernmembran, Schrumpfung der Zelle, Kondensierung und Fragmentierung des Chromatins, Entstehung von Apoptosekörperchen, die von Makrophagen und benachbarten Zellen ohne Entzündungsreaktion phagozytiert werden.

Im Verlauf von Morphogenese und Differenzierung sowie zur Abwehr schädigender Einflüsse und zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase im Organismus müssen in bestimmten Situationen körpereigene Zellen entfernt werden [35, 80, 252]. Um die Integrität des Gesamtorganismus nicht zu gefährden, ist die Eliminierung der Zellen einer genauen Regulation unterworfen, deren Programm und biochemischer Apparat Bestandteil jeder Körperzelle ist [80]. Ein solcher geregelter physiologischer Zelluntergang wird als Apoptose bezeichnet, der sich in grundlegender Weise von der unregulierten Nekrose unterscheidet [81]. Die Apoptose ist durch charakteristische morphologische Veränderungen gekennzeichnet (Abb. 6) [111, 131]: eine blasige Veränderung der Plasma- und Kernmembran, Schrumpfung der Zelle sowie Fragmentierung und Kondensierung des Chromatins. Die Zellorganellen werden nicht geschädigt und der Zellinhalt tritt nicht in die Umgebung aus. Der physiologische Zelltod mündet in sogenannten Apoptose-Körperchen, die von Makrophagen und benachbarten Zellen ohne Entzündungszeichen phagozytiert werden. Im Gegensatz hierzu geht die Nekrose mit einer Schwellung der Zellen und

Schädigung der Organellen einher. Der Zellinhalt tritt in die Umgebung aus, und die nachfolgende Phagozytose der Zellreste ist mit einer Entzündungsreaktion verbunden. Biochemisch lässt sich bei der Apoptose eine Aktivierung von Proteinasen und endogenen Nukleasen nachweisen [131]. Der Abbau der DNA führt zunächst zu großen DNA-Fragmenten von 50-300 Kilobasen, die in der Folge weiter bis zu Fragmenten von 180 Basenpaaren abgebaut werden und sich elektrophoretisch als charakteristische Leitern darstellen. Weiterhin findet man eine erhöhte Glutaminase-Aktivität. Bei der Aktivierung der Apoptose-Enzyme spielen Ca^{++} - und Mg^{++} -Ionen eine zentrale Rolle.

In Zellen, die einen genetischen Schaden tragen, ist die Initiation der Apoptose in erster Linie von der Funktion des Wildtyp-p53-Phosphoproteins abhängig, das für eine Unterbrechung in der späten G_1 -Phase des Zellzyklus verantwortlich ist, bis eine Reparatur des genetischen Schadens stattgefunden hat oder die Apoptose der Zelle eingeleitet wird [44, 143]. Aber ein weiteres Protein mit einer Molekülmasse von 25 kD, das als BCL-2 (B-cell lymphoma-2) bezeichnet wurde, ist in die Regulation des programmierten Zelltods involviert, indem es die Apoptose in vielen Zellsystemen sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch im Tumorgewebe inhibiert und wahrscheinlich durch Blockierung des programmierten Zelltods zu einem Wachstumsvorteil für Zellen führt [35, 97, 136, 201, 215]. Die Bedeutung dieses Onkogens war primär bei follikulären B-Zell-Lymphomen entdeckt worden [274, 275]. Das BCL-2 Gen, das normalerweise bei 18q21.3 lokalisiert ist, befindet sich bei dieser Tumorerkrankung in Juxtaposition mit starker Überexpression auf dem Locus der schweren Immunglobulin-Ketten 14q32. Hierbei werden vermehrt BCL-2-mRNA und das von ihr kodierte Protein produziert [171]. Aber eine erhöhte BCL-2-Expression wurde ebenfalls bei epithelialen Malignomen wie Karzinomen der Bronchien [77, 207], Schilddrüse [209], Brust [53], Niere [35], Ovarien [142] und des Magens [147] genauso wie bei kolorektalen Adenokarzinomen [5] gefunden [206].

1.2.7 Die BCL-2 Familie

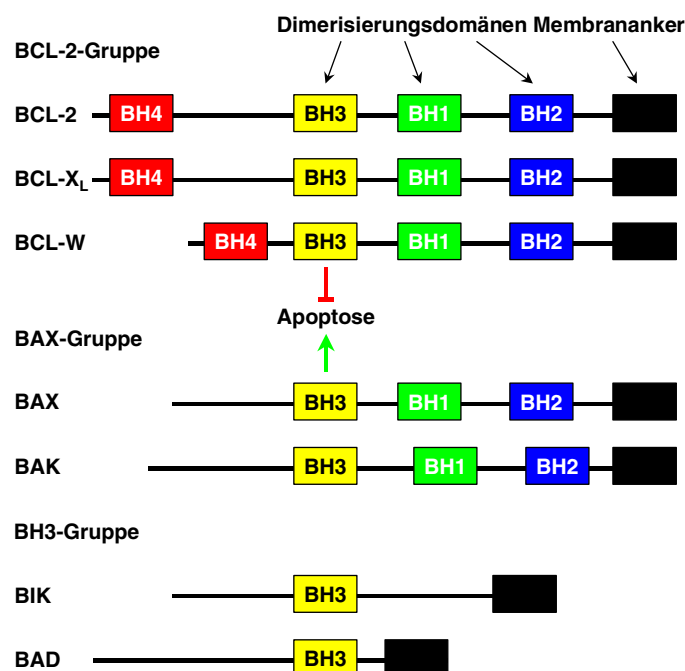


Abb. 7: Die wichtigsten Mitglieder der BCL-2 Familie, die mindestens 15 strukturell verwandte Proteine umfaßt, die zum Teil die Apoptose hemmen, zum Teil fördern. Alle Mitglieder dieser Familie besitzen mindestens eine von vier im Laufe der Vertebraten-Evolution konservierten BCL-2-Homologiedomänen (BH1-BH4).

BCL-2 ist der Namensgeber für eine Familie von mindestens 15 strukturell verwandten Proteinen (Abb. 7) [1, 129, 190]. Alle Mitglieder dieser Familie besitzen zumindest eine von vier konservierten Domänen, die als BCL-2-Homologiedomänen bezeichnet und mit nachgestellten Ziffern unterschieden werden (BH1-BH4), und können die Apoptose entweder fördern oder hemmen. Mitglieder der anti-apoptotischen Gruppe wie BCL-2 besitzen mindestens eine BH1- und BH2-Domäne, wobei am häufigsten alle vier Domänen vorhanden sind [1]. In der pro-apoptoti-

schen Gruppe gibt es zwei Untergruppen: Mitglieder der einen Untergruppe wie BAX (BCL-2 associated X protein) mit einer Molekülmasse von 21 kD und kodiert auf dem Locus 19q13.3-q13.4 besitzen drei Domänen (BH1-BH3), Mitglieder der zweiten Untergruppe nur die BH3-Domäne. Die BH3-Domäne ist für die „Killer“-Funktion von den Mitgliedern der zweiten Untergruppe essentiell [1, 129].

Während die Transkription von BAX durch Wildtyp-p53 stimuliert wird [180], wird durch Überexpression von Wildtyp-p53 zugleich über die Interaktion von p53 mit Proteinen, die an die TATA-Box, eine bedeutende Konsensussequenz der Promotorregion vieler Gene, binden, die Transkription von BCL-2 gehemmt (Abb. 5) [133]. Entscheidend für die Regulation der Apoptose ist das Gleichgewicht zwischen Apoptosehemmern wie BCL-2 und Apoptoseförderern wie BAX, wobei sich bei Überwiegen von BCL-2 BCL-2-Homodimere bilden können [200]. Im Gleichgewichtszustand lagern sich in vitro BCL-2 und BAX zu Heterodimeren zusammen [200], wobei es Kontroversen gibt, ob es zu dieser Assoziation auch in vivo kommt [105, 106]. Bei einem Überschuß von BAX ist die Bildung von Homodimeren aus BAX möglich [1].

BCL-2 ist mit seinem C-terminalen, hydrophoben Membrananker an der zytoplasmatischen Seite der Membranen von Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum und des Zellkerns lokalisiert [1, 97]. Die Assoziation von BCL-2 mit Mitochondrien ist von besonderer funktioneller Bedeutung [81]. Im Verlauf der Apoptose gelangt Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma [1, 80, 238]. Im Zytoplasma assoziiert Cytochrom c mit einem Protein, welches als APAF-1 (apoptosis activating factor 1) bezeichnet wird. Durch Bindung von Cytochrom c ändert sich die Konformation von APAF-1. Hierdurch wird eine Domäne aktiviert, die auch in verschiedenen Caspasen, einer Gruppe von Cystein-Proteinasen, die Peptide ausschließlich hinter Aspartatresten spaltet, vorkommt (CARD = caspase recruiting domain). Die aktivierte Domäne bindet und aktiviert die Procaspase-9. Die aktivierte Caspase-9 setzt eine Caspase-Kaskade in Gang [270]. BCL-2 verhindert direkt oder indirekt die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und hemmt auf diese Weise eine Aktivierung der Caspase-Kaskade [1, 80].

1.2.8 Maligne Progression

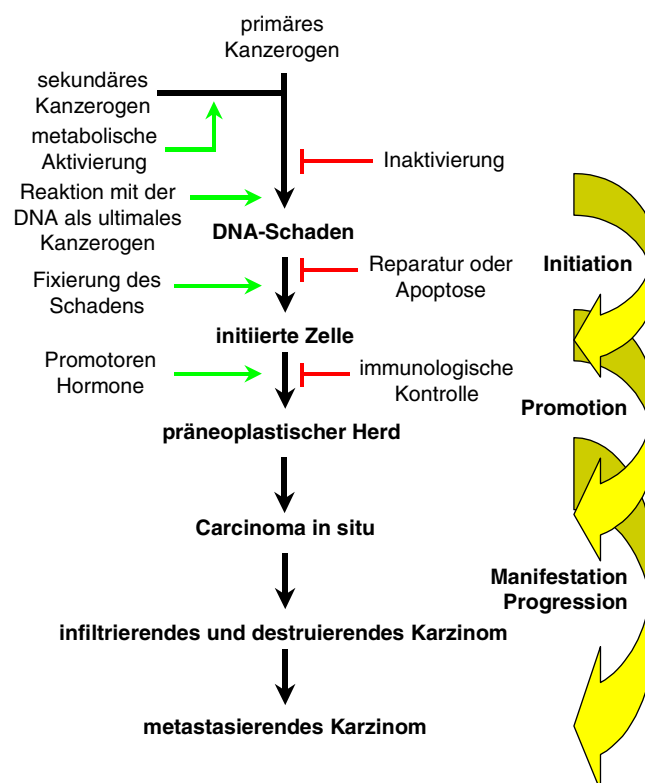


Abb. 8: Formaler Ablauf der Kanzerogenese in ihren drei Phasen.

Die Kanzerogenese ist ein Prozeß, der über sehr unterschiedlich lange Zeiträume ablaufen kann und in dem drei Abschnitte zu unterscheiden sind (Abb. 8) [189]. In der ersten Phase kommt es zur Initiation, bei der im Falle einer chemisch induzierten Kanzerogenese ein primä-

res Kanzerogen oder ein sekundäres Kanzerogen nach metabolischer Aktivierung mit der DNA als ultimates Kanzerogen reagiert. Kokanzerogene können die Kanzerogenese etwa durch Bahnung des Zugangs von Kanzerogenen zum Genom fördern. In der ersten Phase der Initiation besteht die Möglichkeit einer Inaktivierung oder Ausgrenzung des Kanzerogens als Abwehrmechanismus durch den Organismus, bevor eine Reaktion mit der DNA stattfindet. Wenn ein Schaden im Genom aufgetreten ist, kann die Entstehung eines Karzinoms durch Reparatur des genetischen Schadens oder Einleitung der Apoptose der im Genom geschädigten Zelle verhindert werden, woran die in den Abschnitten 1.2.2 bis 1.2.7 genannten Faktoren beteiligt sein können. In dieser Phase der Kanzerogenese sind die veränderten Zellen zunächst als solche nicht erkennbar.

Kommt es aber zur Fixierung des Schadens, kann die initiierte Zelle unter dem Einfluß von Promotoren einen präneoplastischen Herd und weiter ein Carcinoma in situ bilden. In der dann folgenden Phase der Manifestation und Progression zum infiltrierenden, destruierenden und letztlich metastasierenden Karzinom bestimmen dann aber andere Faktoren den Fortgang der Kanzerogenese als bei der Initiation. Denn ein autonomes Wachstum der Tumorzellen ist für ein invasives Wachstum und eine spätere Metastasierung allein nicht ausreichend. Ein verdrängendes Tumorstück, wie es bei vielen gutartigen Tumoren zu beobachten ist, ist zwar durch Zellteilung und das Wiedererreichen der ursprünglichen Zellgröße nach der Zellteilung erklärbar, die Invasivität beim Wachstum von malignen Tumoren jedoch nicht. Hier spielen Faktoren eine Rolle, die die Kohäsion der Tumorzellen untereinander und die Adhäsion an andere Strukturen regulieren und die zur Auflösung von den Tumorzellen benachbarten Strukturen führen. Die Grenze des invasiven Wachstums liegt bei den Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx zwischen dem Carcinoma in situ und dem manifesten Plattenepithelkarzinom, das sich vom Carcinoma in situ zunächst nur durch die infiltrierte und destruierte Basalmembran unterscheidet. Ohne Überschreiten der Basalmembran ist kein weiteres Vordringen des Tumors in den Organismus vorstellbar. Ebenso besteht auch kein Kontakt zum Lymph- oder Blutgefäßsystem, der für eine Metastasierung Voraussetzung ist.

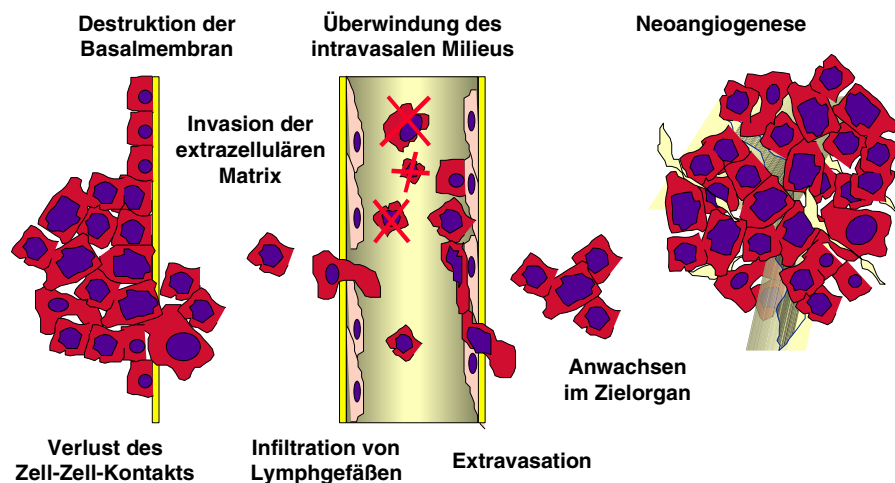


Abb. 9: Formaler Ablauf der Infiltration, Destruktion und Metastasierung von malignen Tumoren.

Im Verlauf der Progression (Abb. 9) durchdringen die Tumorzellen die Basalmembran und erfüllen damit ein wesentliches Definitionskriterium maligner Tumoren [55, 289]. Die Tumorzellen wandern in das subepitheliale Bindegewebe ein, bewegen sich in Lymphspalten und Bindegewebe weiter (Invasion) und können aktiv Bestandteile des Bindegewebes abbauen (Destruktion). Tumorzellen oder Tumorzellnester lösen sich dabei aus dem Zellverband. Voraussetzung dafür ist der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion, die für den normalen Zusammenhalt des Epithels verantwortlich ist. Der Einbruch von Tumorzellen in die Lymph- und/oder Blutgefäße ist der erste Schritt zur Metastasierung. Zellen, denen es gelingt das intravasale Milieu zu überstehen, können das Endothel mit der endothelialen Basalmembran durchdringen und das subendotheliale bindegewebige Stroma invadieren. Hier bilden sich schließlich solide Metastasen heran, die durch neu gebildete Kapillaren aus vorhandenen Blutgefäßen (Neoangiogenese) versorgt werden.

Neben anderen Faktoren sind Zelladhäsionsmoleküle an allen Schritten der malignen Progression beteiligt [102, 305]. Durch Verlust und Dysregulation von Zelladhäsionsmolekülen geht die geordnete Gewebsstruktur verloren und Tumorzellen können sich aus dem Gewebsverband lösen [86]. Voraussetzung für die Infiltration bindegewebiger Strukturen ist die Expression von Adhäsionsmolekülen, die an Bestandteile der extrazellulären Matrix binden. Die Adhäsion von Zellmembranrezeptoren lymphogen metastasierender Tumorzellen an Liganden der Lymphgefäße in Lymphknoten ist eine wichtige Vorbedingung für die Ausbildung von Lymphknotenmetastasen. Hämatogen metastasierende Tumorzellen können über Zelladhäsionsmoleküle an Endothelzellen und die endotheliale Basalmembran binden und damit die Ausbildung von Fernmetastasen induzieren [86, 102].

1.2.9 E-Cadherin

Der Name Cadherin leitet sich aus dem Begriff Calcium-abhängiges Adherin ab. Zur Cadherin-Familie zählen verschiedene Moleküle wie epitheliales (E-Cadherin), neuronales (N-Cadherin), plazentäres (P-Cadherin) und osteoblastäres bzw. mesenchymales (OB-Cadherin) Cadherin [183] sowie die Cadherine 6 und 11 [237]. Cadherine spielen eine fundamentale Rolle in der Embryonalentwicklung, da sie für die Segregation unterschiedlicher Gewebe während der Ontogenese verantwortlich sind [86, 185].

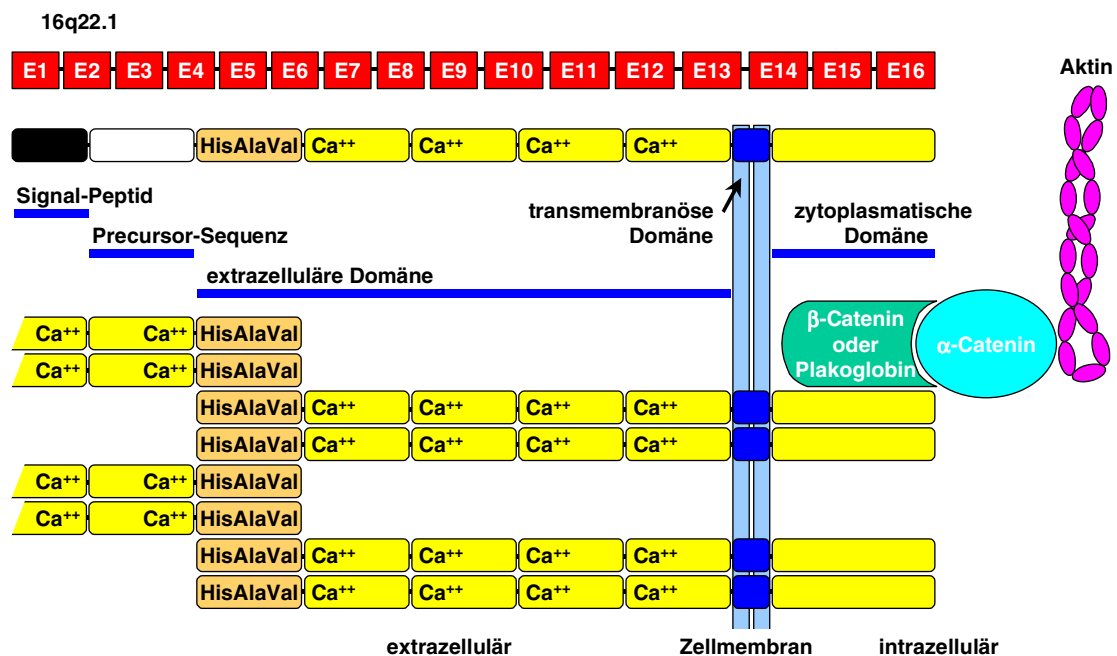


Abb. 10: Schematischer Aufbau von E-Cadherin, das durch ein 16 Exons (E1-E16) umfassendes Gen auf dem langen Arm von Chromosom 16 kodiert wird. Der extrazelluläre Anteil ist in fünf repetitive Domänen untergliedert, deren N-terminale das für alle klassischen Cadherine gemeinsame Bindungsmotiv aus den drei Aminosäuren Histidin (His), Alanin (Ala) und Valin (Val) enthält. Die Zusammenlagerung von E-Cadherin-Monomeren zu Dimeren setzt die Bindung von Ca⁺⁺-Ionen voraus. Die zyttoplasmatische Domäne geht eine direkte Bindung mit β-Catenin oder Plakoglobin (γ-Catenin) ein, α-Catenin bildet die Brücke zu intrazellulären Aktinfilamenten des Zytoskeletts.

E-Cadherin ist ein Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 120 kD. Funktionell handelt es sich um ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, das Epithelzellen über Calcium-abhängige, homotypische Interaktionen verbindet (Abb. 10) [263, 264]. Seine Expression wird während der Embryonalentwicklung reguliert und korreliert mit verschiedenen morphogenetischen Vorgängen, bei denen Zellaggregation und -disaggregation eine Rolle spielen [86]. E-Cadherin ist der wichtigste Mediator der interzellulären Adhäsion von Epithelzellen; seine Funktion ist außerdem entscheidend für die Induktion und Aufrechterhaltung der Zellpolarität und Differenzierung in vitro und in reifen epithelialen Geweben [86]. E-Cadherin wird jedoch nicht nur auf epithelialen Zellen exprimiert, sondern auch auf erythropoetischen Zellen verschiedener definierter Reifestadien [28].

Das kodierende Gen konnte auf dem langen Arm von Chromosom 16 (16q22.1) lokalisiert werden [40] und umfasst 16 Exons, die sich über etwa 100000 Basenpaare erstrecken [18]. Der mo-

lekulare Aufbau des E-Cadherin-Proteins weist 5 Tandem-repetitive extrazelluläre Domänen, ein einzelnes transmembranöses Segment und eine zytoplasmatische Region auf (Abb. 10) [86, 185]. Es wird zunächst als Precursor-Polypeptid mit einer Molekülmasse von 135 kD synthetisiert und nach Addition von komplexen Kohlenhydrat-Gruppen im Golgi-Apparat und Umwandlung in das fertige 120-kD-Glykoprotein an der Zelloberfläche exprimiert. Es hat dort eine Halbwertszeit von etwa 5 h [118]. Die N-terminale extrazelluläre Domäne vermittelt den Zell-Zell-Kontakt; die zytoplasmatische Region interagiert über die Catenine (α -, β - und γ -Catenin) mit dem Zytoskelett [86, 242, 272]. Das α -Catenin hat eine Molekülmasse von 102 kD und wird auf dem Chromosom 5 bei 5q21-22 kodiert. Es besitzt eine strukturelle Ähnlichkeit zu Vinculin, einem Zytoskelett-Protein, welches in zellulären Kontaktstellen zur extrazellulären Matrix eine bedeutende regulatorische Funktion erfüllt und den Kontakt mit Aktinfilamenten herstellt [184]. Wie Vinculin ist auch α -Catenin ein Aktin-bindendes Protein, das E-Cadherin mit dem Zytoskelett verbindet. Das β -Catenin mit einer Molekülmasse von 88 kD wird auf dem Locus 3p21 kodiert und bindet direkt an E-Cadherin [272]. Da es auch mit α -Catenin assoziieren kann, bildet es eine Brücke zwischen E-Cadherin und α -Catenin. Das γ -Catenin mit einer Molekülmasse von 82 kD ist identisch mit Plakoglobin, einem Protein, welches zuerst auf Desmosomen isoliert wurde. Plakoglobin und β -Catenin sind strukturell verwandt. Wie β -Catenin bindet auch Plakoglobin sowohl an E-Cadherin als auch an α -Catenin. Man nimmt an, daß neben β -Catenin auch Plakoglobin die Brücke zwischen E-Cadherin und dem Zytoskelett herstellen kann [118]. Biochemische Veränderungen, wie eine Tyrosin-Phosphorylierung von β -Catenin, können die Funktion des Cadherin-vermittelten Zelladhäsionssystems unter physiologischen wie auch unter pathologischen Bedingungen modulieren oder supprimieren. Dabei kann die Tyrosin-Phosphorylierung auch durch Onkogene und Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel EGF (epidermal growth factor) und HGF (hepatocyte growth factor), vermittelt werden [241].

Außer dem E-Cadherin ist auch der EGF-Rezeptor (EGF-R) im Bereich der interzellulären Zonulae adhaerentes lokalisiert. Durch Stimulation mit EGF kommt es zu einer starken Autophosphorylierung des EGF-R sowie zur Phosphorylierung verschiedener Zytoskelett-assoziiierter Proteine, wie zum Beispiel Ezrin, Vinculin und Spectrin [95]. EGF vermittelt vielfältige biologische Prozesse, einschließlich Veränderungen der Zellmorphologie und Induktion des Zelltods. Wenn EGF oder TGF- α (transforming growth factor α) an den EGF-R binden, überträgt der EGF-R durch seine Tyrosin-Kinase einen mitogenen Stimulus [241]. Die enge Ko-Lokalisation des EGF-R mit dem E-Cadherin-Catenin-Komplex läßt dabei an die Möglichkeit von gemeinsamen physiologischen Funktionen denken.

Die Cadherin-Funktion ist Calcium-abhängig [263]: Die gebundenen Ca^{++} -Ionen linearisieren und versteifen das Molekül nicht nur, sondern fördern auch die Dimerisierung der extrazellulären Domäne. Ca^{++} -Ionen-Entzug hebt die Zell-Adhäsionsaktivität des Cadherins auf, macht Cadherine abbaubar für Proteasen und induziert beim E-Cadherin eine dramatische, reversible Konformationsänderung der gesamten extrazellulären Region [185].

Da eine reduzierte interzelluläre Adhäsion von Karzinomzellen häufig mit einer Reduktion bzw. einem Verlust der E-Cadherin-Expression einhergeht, wird postuliert, daß dem funktionellen Verlust von E-Cadherin eine Bedeutung bei der Tumorausbreitung zukommt [23, 265, 118]. Die Karzinomzellen konvertieren dabei in eine Art „mesenchymalen Zustand“, wie während der normalen Embryonalentwicklung [23]. Dabei sind Tumor-Promotoren wie Phorbol ester und Benzoyl-Peroxid im Zellkulturmodell in der Lage, die Expression und membranöse Lokalisation von E-Cadherin bei verschiedenen Zelltypen zu vermindern [115], während der Differenzierungsinduktor all-trans-Retinolsäure die Funktion des E-Cadherin/Catenin-Komplexes in der menschlichen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 hochzuregulieren vermag [280]. Ein Verlust der E-Cadherin-Expression wird dabei von einem deutlichen Anstieg des Plasminogen-Aktivators vom Urokinase-Typ (uPA) begleitet, der die Invasion fördert [69]. E-Cadherin ist auch an der Steuerung der uPA-Verteilung beteiligt: Eine erhöhte Ca^{++} -Konzentration zusammen mit einem funktionsfähigen E-Cadherin kann die uPA-Verteilung von der perinukleären Region zur Zelloberfläche hin verschieben [117].

1.2.10 CD44

CD44 bezeichnet eine Gruppe von heterogenen Glykoproteinen, die in unterschiedlichen Formen in den verschiedensten Zellen und Geweben gebildet werden. Strukturell und funktionell gehört CD44 zur Familie der Hyaluronsäure-bindenden Hyaladherine. Weitere Mitglieder dieser Familie sind das Link-Protein des Knorpels sowie die Proteoglykane Aggrecan und Versican

[186]. CD44 wurde primär in seiner 85 kD-Variante, der sog. hämatopoetischen- (CD44h) oder Standardform (CD44s), auf Lymphozyten nachgewiesen [85, 99]. Bald schon zeigte sich, daß das CD44 auch auf anderen Zelltypen wie Epithelien, mesenchymalen Zellen und Endothelien vorkommt und dabei keineswegs immer in der gleichen Molekülgröße vorliegt [152, 153]. Vielmehr weisen die CD44 Moleküle eine enorme Heterogenität auf. Diese Heterogenität der CD44-Familie ist auf sogenanntes alternatives Spleißen [84, 153, 226] des auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 bei 11pter-p13 lokalisierten CD44-Gens zurückzuführen (Abb. 11) [235]. Die genetische Analyse ergab, daß dieses Gen aus 20 Exons besteht, die sich über etwa 60000 Basenpaare erstrecken [226, 227]. Die N-terminalen fünf Exons (S1-S5) und die C-terminalen fünf Exons (S6-S10) kodieren für die CD44-Standard- bzw. hämatopoetische Form, die eine N-terminale Domäne (248 Aminosäuren: Exons S1-S7) mit einer spezifischen Affinität zur Hyaluronsäure, einem wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix, eine transmembranöse Region (23 Aminosäuren: Exon S8) und einen zytoplasmatischen Anteil, der durch alternatives Spleißen entweder kürzer (3 Aminosäuren: Exon S9) oder länger (70 Aminosäuren: Exon S10) ist, aufweist. Die zehn dazwischen liegenden Exons werden in der Standardform nicht exprimiert. Nur durch alternatives Spleißen, das heißt durch post-transkriptionelle Modifikationen der prä-mRNA können Transkripte dieser varianten Exons (V1-V10) entstehen. Aufgrund eines Stop-Codons wird Exon V1 jedoch nicht transkribiert. Die variablen Molekülanteile werden in die extrazelluläre Region des Moleküls distal der Zellmembran eingebaut und inserieren dort zwischen den Standard-Exons S5 und S6 (Abb. 11). Dies führt zu den varianten CD44-Isoformen (CD44v). Obwohl multiple Kombinationen von varianten Exons beschrieben sind, werden einige dieser Kombinationen bevorzugt auf bestimmten Gewebetypen exprimiert, wie zum Beispiel die sogenannte epitheliale Form (Exon V8-V10), der Keratinozyten-Typ (V3-V10) sowie die sogenannten metastasierungsassoziierten Typen (V4-V7 und V6-V7) [26, 310]. Man geht davon aus, daß die Translation der varianten Exons der Regel der 3'-5'-Verknüpfung folgt. Es gibt jedoch insofern Ausnahmen von dieser Regel als individuelle Zellen eine Vielzahl von Kombinationen der Spleiß-Varianten exprimieren können, wobei die individuellen Kombinationen nicht unbedingt sequentielle Exons enthalten müssen [227]. Schließlich können die Zellen auch in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand wiederholt ihr Spleiß-Verhalten ändern. Die Mechanismen, die das alternative Spleißen des CD44 regulieren, sind noch weitgehend unbekannt.

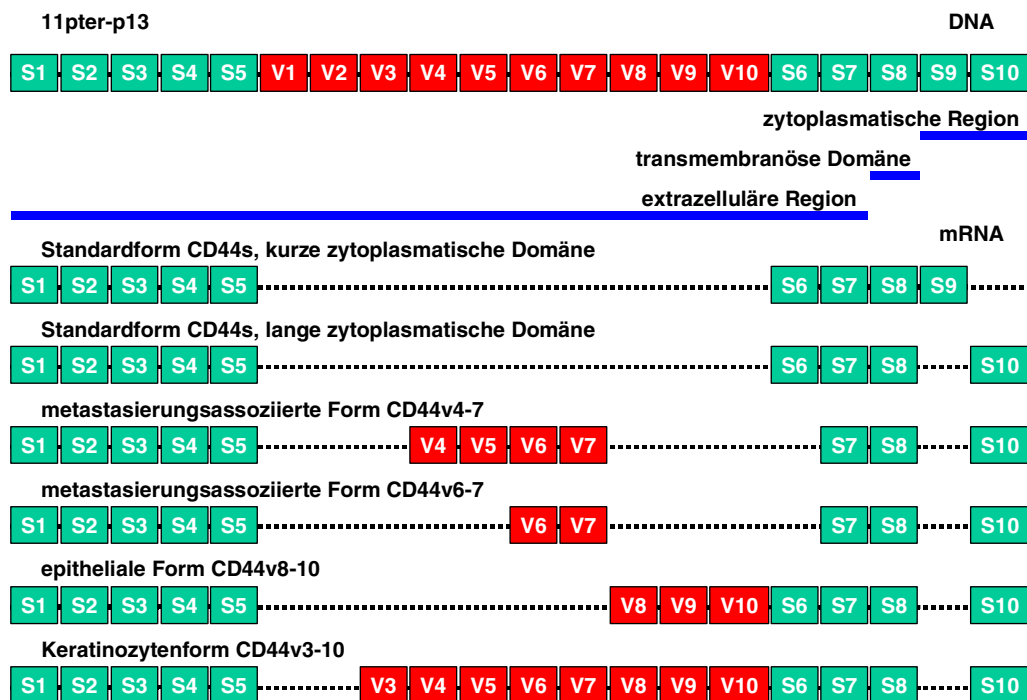


Abb. 11: Das Gen für die als CD44 bezeichnete Gruppe heterogener Glykoproteine befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 und besteht aus 20 Exons. Die Heterogenität der Gruppe ist durch alternatives Spleißen der prä-mRNA bedingt. Die extrazelluläre Region umfaßt die Standard-Exons S1-S7 und verschiedene Anteile der varianten Exons V2-V10, die transmembranöse Domäne das Standard-Exon S8 und die zytoplasmatische Region entweder das für 3 Aminosäuren kodierende Standard-Exon S9 oder das für 70 Aminosäuren kodierende Standard-Exon S10. Aufgrund eines Stop-Codons wird das variante Exon V1 beim Menschen nicht transkribiert.

Die extrazelluläre Region des CD44s wird posttranslatorisch ausgiebig glykosyliert [186]. Sie enthält sechs N- und sieben O-glykosidische Glykosylierungsstellen, an die Oligosaccharide gekoppelt sind. Überdies finden sich auch vier Serin-Glycin-Motive, an die Chondroitinsulfat- oder Heparansulfat-Glykosaminoglykane, die das Molekül als Mitglied der Proteoglykane identifizieren, gebunden sein können [89]. Durch das alternative Spleißen können zusätzlich bis zu 420 Aminosäuren extrazellulär eingebaut werden. Diese varianten Exons statten die kodierte Region zum einen mit weiteren Aminosäure-Resten für posttranslatorische Glykosylierungen und Chondroitinsulfat-Seitenketten aus, zum andern ist diese Region äußerst hydrophil und könnte so den varianten CD44-Isoformen zusätzliche Bindungseigenschaften verleihen [84]. Als Liganden für die Standardregion sind extrazelluläre Matrixkomponenten beschrieben worden, insbesondere Hyaluronsäure [146, 278], aber auch Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronektin [114, 202] sowie sulfatierte Proteoglykane [271]. Die Bindung an Hyaluronsäure wird von zwei Regionen vermittelt, die von Exon S2 und S5 kodiert werden [204, 304]. Mit aktivierenden Antikörpern konnte gezeigt werden, daß diese Bindung nicht konstitutiv ist, sondern moduliert werden kann [151]. Die meisten Zellen, die CD44s und CD44v exprimieren, binden nämlich dennoch nicht an Hyaluronsäure. Wahrscheinlich wird die Hyaluronsäure-Bindungsfähigkeit nicht allein durch die An- oder Abwesenheit der varianten Region [248] reguliert, sondern durch Konformationsänderungen in der extrazellulären Region oder durch Umverteilung auf der Zelloberfläche. Der zytoplasmatische Molekülanteil scheint in diese Modulation involviert zu sein [113]. Einen potentiellen Regulationsmechanismus für das Bindungsverhalten stellt auch die Glykosylierung des CD44 dar [10, 150]. Schließlich wird auch einem Cystein-Rest in der transmembranösen Region des Moleküls Bedeutung für die Hyaluronsäure-Bindung zugeschrieben. Andererseits kann CD44 auch am Abbau von Hyaluronsäure beteiligt sein [46, 279].

Es wird vermutet, daß der intrazytoplasmatische Anteil des CD44 an der Signal-Transduktion [260] und Interaktion mit dem Zytoskelett beteiligt ist, um die Migration und/oder Zellteilung zu regulieren; überdies scheint die transmembranöse Domäne des CD44 für die Signalübertragung von außen nach innen wichtig zu sein [113, 153]. Die zytoplasmatische Region ist an zwei Serin-Resten phosphoryliert, jedoch regelt die Phosphorylierung nicht die Membranlokalisation und die Beziehungen zum Zytoskelett [187]. Für einige Funktionen des CD44 ist die Bindung an das Zytoskelett über das zytoskelettale Protein Ankyrin essentiell, für das mindestens eine spezifische Bindungsstelle in der intrazytoplasmatischen CD44s-Domäne nachgewiesen werden konnte [309]. Die Hyaluronsäure-Bindung induziert dabei eine Bildung von Plaque-artigen Adhäsionsstrukturen und intrazellulären Ankyrin-Akkumulationen direkt unterhalb des CD44s. Die epitheliale 140 kD-Isoform (CD44e bzw. CD44v8-v10) scheint dagegen bevorzugt über Mitglieder der sog. ERM-Familie (Ezrin, Radixin, Moesin) mit dem zytoskelettalen Aktin zu interagieren [276], während dies für die Standardform nicht zutrifft. Die genannte Gruppe geht dabei von einem größeren Membrankomplex aus, an dem auch das CD43 via ERM-Gruppe beteiligt ist und in dessen Zentrum sich das CD44e befindet.

Funktionell ist die kleinste Spleiß-Variante CD44s an der Bindung der Lymphozyten an das „hohe“ Endothel epitheloider Venolen und am „Lymphozyten-Homing“ beteiligt [52]. Das CD44s wird jedoch physiologischerweise nicht nur auf Lymphozyten exprimiert, sondern auch auf den meisten mesenchymalen Zellen, neuroektodermalen Zellen und bestimmten Epithelien [160, 268]. Dagegen finden sich physiologischerweise CD44-Varianten (CD44v) weit weniger häufig. Obwohl die meisten Epithelien und hämatopoetischen Organe während der Embryonalentwicklung CD44v-positiv sind, beschränkt sich die CD44v-Expression im adulten Organismus vorwiegend auf die Haut, das Darmepithel und verschiedene Drüsen [268]. Dabei korreliert die CD44v-Expression stets mit einer hohen Zellproliferationsrate. Bemerkenswert ist überdies, daß auch innerhalb der CD44v-positiven Gewebe verschiedene Zellschichten nur ganz bestimmte CD44v-Isoformen exprimieren, was auf strikte Regulationsmechanismen des alternativen Spleißens und auf divergente Funktionen dieser Isoformen hinweist [310].

Die CD44s-Form wird überdies unabhängig von deren Fähigkeit zur Metastasierung auch auf der Oberfläche vieler Tumorzellen gefunden. Einige experimentelle Befunde zeigten aber, daß bei manchen Tumorzellen das Wachstum in vivo offenbar durch Interaktion von CD44 mit bestimmten Liganden wie der Hyaluronsäure durch Transfektion mit CD44s-cDNA gefördert werden kann. Bessere Einblicke in die Funktion des CD44 bei der Metastasierung wurden durch Verwendung eines Antikörpers erzielt, der ein Epitop innerhalb der von Exon V6 kodierten Sequenz erkennt. Dieser Antikörper (1.1ASML) war ursprünglich durch Immunisierung mit metastasierenden Tumorzellen eines Pankreaskarzinoms der Ratte gewonnen worden [85, 99]. Diese Ziellinie exprimiert bevorzugt die varianten Exons V4-V7. Mit dem genannten Antikörper

konnte gezeigt werden, daß Spleiß-Varianten, die dieses Epitop enthalten, die (lymphogene) metastatische Tumorausbreitung im Tierversuch steigern können. Durch Einsatz monoklonaler Antikörper oder F(ab')₂-Fragmente gegen das V6-Epitop ließ sich dagegen das Anwachsen von CD44v6 transfizierten Tumorzellen in den regionären Lymphknoten sowie eine hämatogene Metastasierung in die Lunge bei den Versuchstieren verhindern [228]. Dies führte zu der Hypothese, daß CD44v6-Varianten für die initiale Phase der lymphogenen Metastasierung notwendig sind.

2 Patienten

2.1 Klinische Befunde und Therapieverfahren

In diese Studie wurden 107 Patienten einbezogen, die zwischen dem 01.01.1980 und dem 31.12.1990 in der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München wegen eines primären, nicht verhornenden oder verhornenden Plattenepithelkarzinoms (ICD-O 8070/3 und 8071/3) [210, 296] der Mundhöhle und des Oropharynx ausschließlich der Lippen (ICD-O C01-06 und C09-10, Tab. 1) [283] primär chirurgisch und kurativ intendiert therapiert worden waren. Die Indikation zur hier gewählten Therapieform war dabei aufgrund des klinischen Befundes unterstützt durch bildgebende Verfahren, insbesondere durch eine Sonographie des Mundbodens und des Halses, eine Röntgenuntersuchung der dem Tumor benachbarten knöchernen Strukturen und eine Computertomographie der Tumorregion und der ableitenden Lymphwege nach ausführlicher Aufklärung des Patienten und nach dessen Einverständnis gestellt worden. Als Ausschlusskriterien für die Studie dienten Hinweise auf Fernmetastasen in der präoperativen Diagnostik ($M>0$) durch eine klinische Befunderhebung, Röntgenthoraxuntersuchung, Oberbauchsonographie, Ganzkörperskelettszintigraphie und bei Metastasenverdacht durch weitergehende diagnostische Maßnahmen wie Röntgen-Zielaufnahmen, Computertomographie, Kernspintomographie und Punktion oder chirurgische Exploration verdächtiger Befunde oder ein positiver postoperativer mikro- oder makroskopischer Nachweis eines Residualtumors ($R>0$) [245].

Tab. 1: Lokalisationen der untersuchten primären Plattenepithelkarzinome.

Tumorlokalisierung	ICD-O	Anzahl	Anteil
Mundbodenschleimhaut anterior	C04.0	27	25,2%
Mundbodenschleimhaut lateral	C04.1	35	32,7%
Zungenschleimhaut	C01, C02	17	15,9%
Gingiva oder Mukosa im Unterkieferbereich	C03.1	12	11,2%
Schleimhaut im Oropharynx	C09, C10	10	9,3%
Wangenschleimhaut	C06	3	2,8%
Gingiva oder Mukosa im Oberkieferbereich	C03.0, C05	3	2,8%
Summe		107	100,0%

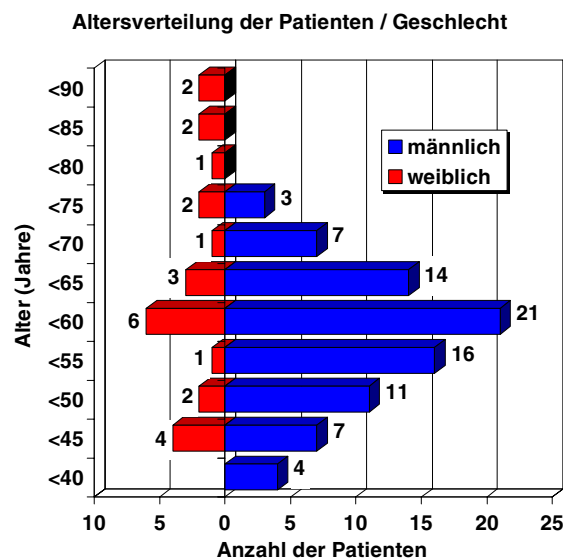


Abb. 12: Altersverteilung der 107 untersuchten Patienten aufgeschlüsselt nach dem Geschlecht zum Zeitpunkt ihrer primären Operation.

24 Patienten (22,4%) waren weiblich und 83 männlich (77,6%, Verhältnis = 1:3,46, Abb. 12). Das durchschnittliche Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt betrug 56,5 Jahre, der Median 56,3 Jahre. Der jüngste Patient war 35,5 Jahre und die älteste Patientin 86,9 Jahre alt. Die Altersverteilung der männlichen (Shapiro-Wilk Test: $W=0,98$, $p=0,37$) [232] und weiblichen Patienten ($W=0,93$, $p=0,11$) war nicht signifikant von einer Gaußschen Normalverteilung zu unterscheiden (Abb. 12). Die weiblichen Patienten (Mittelwert = 61,7 Jahre) waren signifikant älter als die männlichen (Mittelwert = 55,0 Jahre, Students t-Test für unverbundene Stichproben: $p<0,01$). Von 89 Patienten, bei denen eine für diesen Gesichtspunkt gesicherte Anamneseerhebung vorlag, gaben 63 (70,8%) einen regelmäßigen Tabak- und Alkoholkonsum an. 18 Patienten (20,2%) erklärten zwar Tabak geraucht, aber nicht regelmäßig alkoholische Getränke konsumiert zu haben. Die umgekehrte Angabe machten mit 4 Patienten (4,5%) ebenso viele wie die, die sowohl einen Alkohol- als auch einen Tabakabusus verneinten. Als Alkoholabusus wurde hierbei der regelmäßige, tägliche Konsum von mindestens 1 l Bier, 0,5 l Wein oder hochprozentigen alkoholischen Getränken angesehen. Tabakabusus wurde angenommen, wenn der Patient angab, mindestens 10 Zigaretten pro Tag oder entsprechende Mengen von Tabakerzeugnissen anderer Art zu rauchen. Raucher (Mittelwert = 54,1 Jahre) waren zum Operationszeitpunkt signifikant jünger als Nichtraucher (Mittelwert = 68,4 Jahre, Students t-Test für unverbundene Stichproben: $p<0,01$, Abb. 13). Bei den Männern war der Anteil an Rauchern (69 Raucher/3 Nichtraucher) signifikant höher als bei den Frauen (12 Raucher/5 Nichtraucher, Chi-Quadrat-Test: $p<0,01$). Ebenso tranken die männlichen Patienten häufiger Alkohol (59 Alkoholabusus/13 kein Alkoholabusus) als die weiblichen (8 Alkoholabusus/9 kein Alkoholabusus, Chi-Quadrat-Test: $p<0,01$).

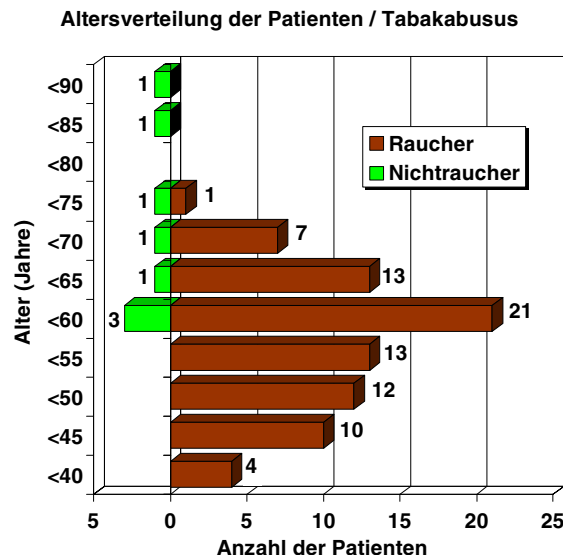


Abb. 13: Altersverteilung zum Zeitpunkt der primären Operation aufgeschlüsselt nach Tabakabusus für die 89 Patienten, für die eine gesicherte Anamneseerhebung für diesen Gesichtspunkt vorlag.

Das Therapiekonzept der Klinik sah als primäre operative Maßnahme eine radikale Tumorsektion mit einem Sicherheitsabstand von 1,5 cm im gesunden Gewebe, gegebenenfalls unter Mitnahme des benachbarten Knochens vor. Bei Infiltration des Unterkieferknochens durch den Tumor wurde eine Unterkieferkontinuitätsresektion mit Überbrückung des Defektes durch eine Unterkieferrekonstruktionsplatte vorgenommen. Die Ausräumung der ableitenden Lymphwege erfolgte durch suprahyoide Blockausräumung unter Einbeziehung des Trigonum caroticum und/oder modifizierte radikale Neck dissection [19], wobei im Unterschied zur klassisch radikalen Neck dissection das Platysma und der Nervus accessorius bei ausreichendem Sicherheitsabstand zum Tumorgewebe geschont wurden [219]. Gemäß dem weiteren Therapiekonzept der Klinik wurde bei Nachweis von Lymphknotenmetastasen in den Resektaten ($pN>0$) eine Radiotherapie mit Co-60 im Tumorgebiet und im Bereich der ableitenden Lymphwege mit einer Dosis von 60 bis 66 Gy durchgeführt.

2.2 Tumornachsorge

Die Nachkontrolluntersuchungen der Patienten erfolgten nach Entlassung aus der stationären Behandlung zunächst ambulant in kürzeren Abständen je nach den Erfordernissen der Wundheilung. Anschließend wurden die Patienten im Rahmen der Tumornachsorge halbjährlich in den ersten zwei postoperativen Jahren, jährlich in den folgenden drei Jahren und anschließend bei Interesse des Patienten zweijährlich zur Tumorsprechstunde einbestellt. Routinemäßig wurden hierbei eine klinische Untersuchung, eine Laboruntersuchung (Blutbild, Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit nach ein und zwei Stunden sowie Bestimmung der alkalischen Phosphatase, der Gammaglutamyltransferase, der Laktatdehydrogenase, des carcinoembryonalen Antigens und des Squamous-Cell-Carcinoma-Antigens im Serum), eine Röntgenuntersuchung des Tumorgebietes und des Thorax sowie eine Sonographie des Mundbodens und des Halses durchgeführt.

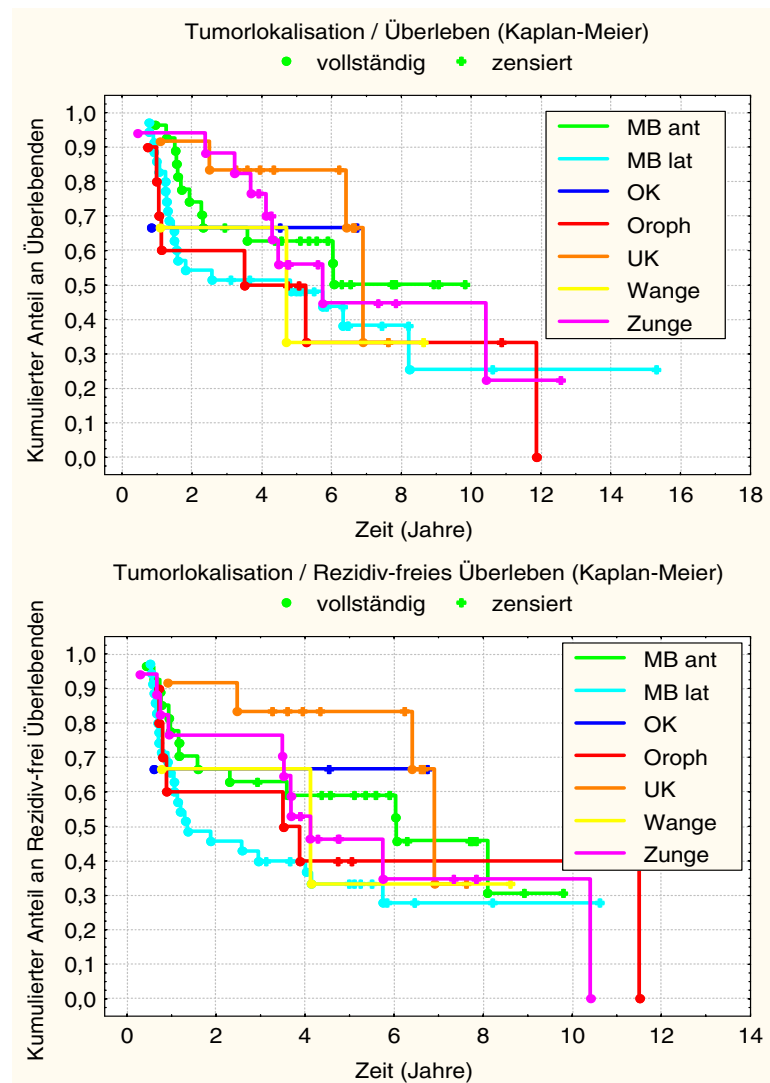


Abb. 14: Überleben und Rezidiv-freies Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation: MB ant = Mundbodenschleimhaut anterior; MB lat = Mundbodenschleimhaut lateral; OK = Gingiva oder Mukosa im Oberkieferbereich; Oroph = Schleimhaut im Oropharynx; UK = Gingiva oder Mukosa im Unterkieferbereich; Wange = Wangenschleimhaut; Zunge = Zungenschleimhaut.

Bei Verdacht auf ein Tumorrezidiv oder einen Zweitumor folgten eine weitergehende Diagnostik und Therapie, die in dieser Studie nicht berücksichtigt wurden. Ausgewertet wurde lediglich der Zeitpunkt des erstmaligen Erkennens eines histologisch gesicherten Tumorrezidivs und der Zeitpunkt des Todes des Patienten unbeeinflusst durch Tumorabhängigkeit oder Tumorunabhängigkeit des Todes. Der Beobachtungszeitraum zur Erhebung der posttherapeutischen Ergebnisse erstreckte sich bis zum 31.12.1996. Bis zu diesem Zeitpunkt waren 56 der 107 Patienten (52,3%) verstorben. Bei den anderen 51 Patienten (47,7%), die entweder noch lebten

und sich noch in der Tumornachsorge befanden oder die aus der Tumornachsorge ausgeschieden waren, bevor das Todesereignis bekannt geworden war, betrug die Nachbeobachtungszeit im Durchschnitt 6,4 Jahre mit einem Minimum von 2,9 Jahren, einem Median von 5,9 Jahren und einem Maximum von 15,3 Jahren. Sowohl die Überlebenszeit als auch die Rezidiv-freie Überlebenszeit der Patienten nach Kaplan und Meier (Abschnitt 3.4) waren tendenziell von der Tumorlokalisation abhängig (Abb. 14): So zeigten Patienten mit Karzinomen im lateralen Mundbodenbereich und im Oropharynx einen besonders schlechten Verlauf, während Patienten mit einem Tumor in der Gingiva oder Mukosa des Unterkiefers und im anterioren Mundbodenbereich eine tendenziell bessere Prognose als die übrigen Patienten hatten. Statistisch signifikant waren diese Unterschiede jedoch nicht.

2.3 Pathoanatomische Befunde

2.3.1 Staging

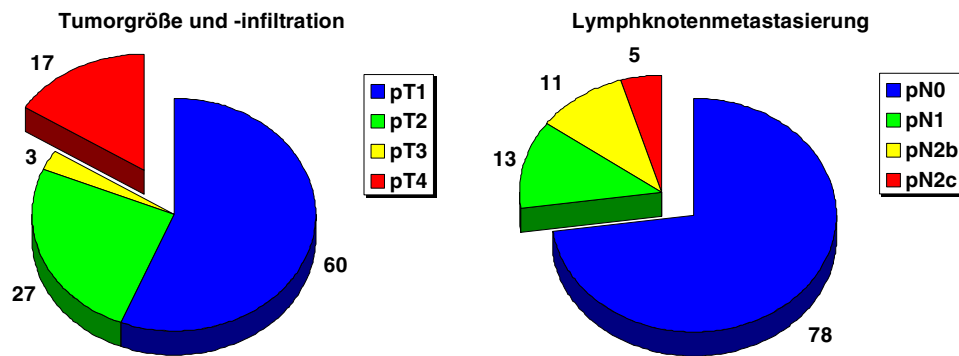


Abb. 15: TNM-Klassifikation (Staging) der Primärtumoren und der regionären Lymphknoten.

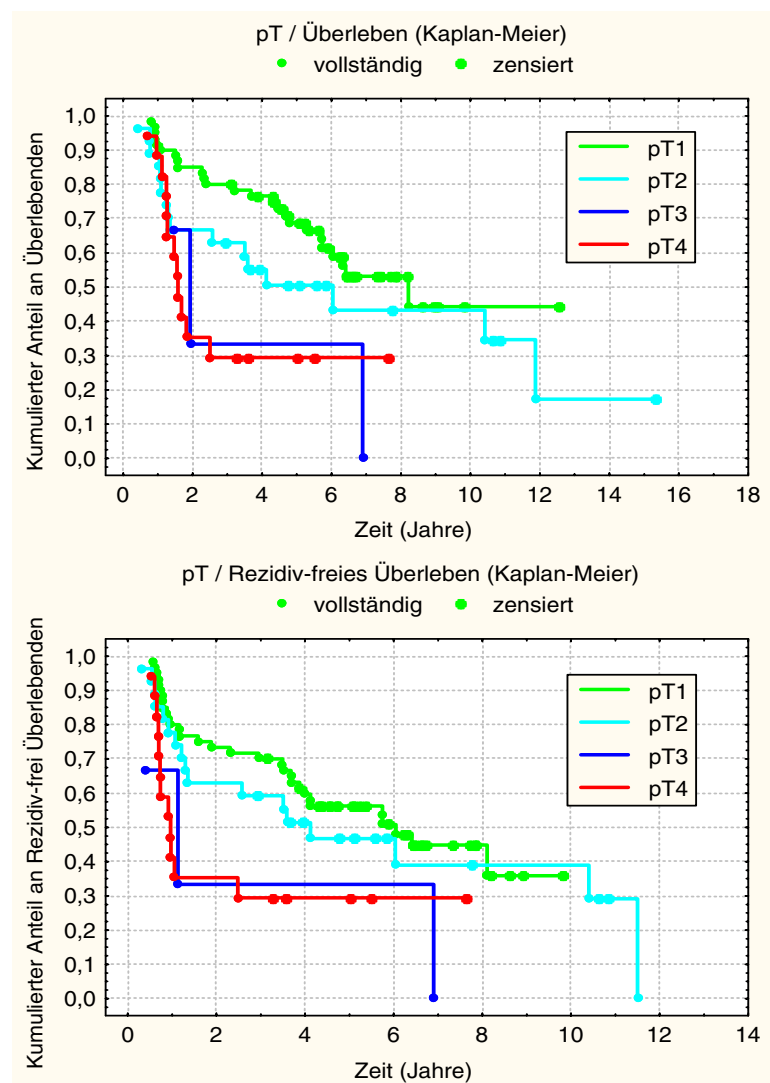


Abb. 16: Die Tumorgroße und -infiltration zeigte einen signifikanten Einfluß auf das Überleben ($p < 0,01$) und Rezidiv-freie Überleben ($p < 0,03$) der Patienten (Kaplan-Meier).

Die Primärtumoren der Patienten wurden postoperativ gemäß der TNM-Klassifikation maligner Tumoren im Bereich der Mundhöhle und des Oropharynx (ICD-O C01-06 und C09-10) [245, 283] eingeteilt (Abb. 15). Über die Hälfte der Tumoren war dabei der Klasse pT1 (Tumordurchmesser bis 2 cm ohne Infiltration von Nachbarstrukturen) zuzuordnen. Der Rest entsprach

überwiegend pT2 (Tumordurchmesser über 2 cm und bis 4 cm ohne Infiltration von Nachbarstrukturen) und pT4 (Infiltration von Nachbarstrukturen wie Skelettmuskulatur der Zunge, Kieferhöhle, Haut oder durch kortikalen Knochen). Tumoren der Kategorie pT3 (Tumordurchmesser über 4 cm ohne Infiltration von Nachbarstrukturen) waren bei den anatomischen Größenverhältnissen in der Mundhöhle und im Oropharynx seltener.

Regionäre Lymphknotenmetastasen waren bei dem überwiegenden Anteil der Patienten nicht nachweisbar (pN0, Abb. 15) [245]. Ansonsten gelang der Nachweis von solitären ipsilateralen Lymphknotenmetastasen mit einem Durchmesser bis zu 3 cm (pN1), multiplen ipsilateralen Lymphknotenmetastasen mit einem Durchmesser bis zu 6 cm (pN2b) und von kontralateralen oder bilateralen Lymphknotenmetastasen mit einem Durchmesser bis zu 6 cm (pN2c). Solitäre ipsilaterale Lymphknotenmetastasen mit einem Durchmesser von über 3 cm und bis zu 6 cm (pN2a) und Lymphknotenmetastasen mit einem Durchmesser von über 6 cm (pN3) wurden in keinem Fall gefunden.

Sowohl die Tumorgöße und -infiltration pT als auch die Lymphknotenmetastasierung pN zeigten bei den untersuchten Patienten einen signifikanten Einfluß auf das Überleben (Abb. 16 und Abb. 17, pT: $p < 0,01$, pN: $p < 0,001$) und Rezidiv-freie Überleben (pT: $p < 0,03$, pN: $p < 0,001$) nach Kaplan und Meier (Abschnitt 3.4).

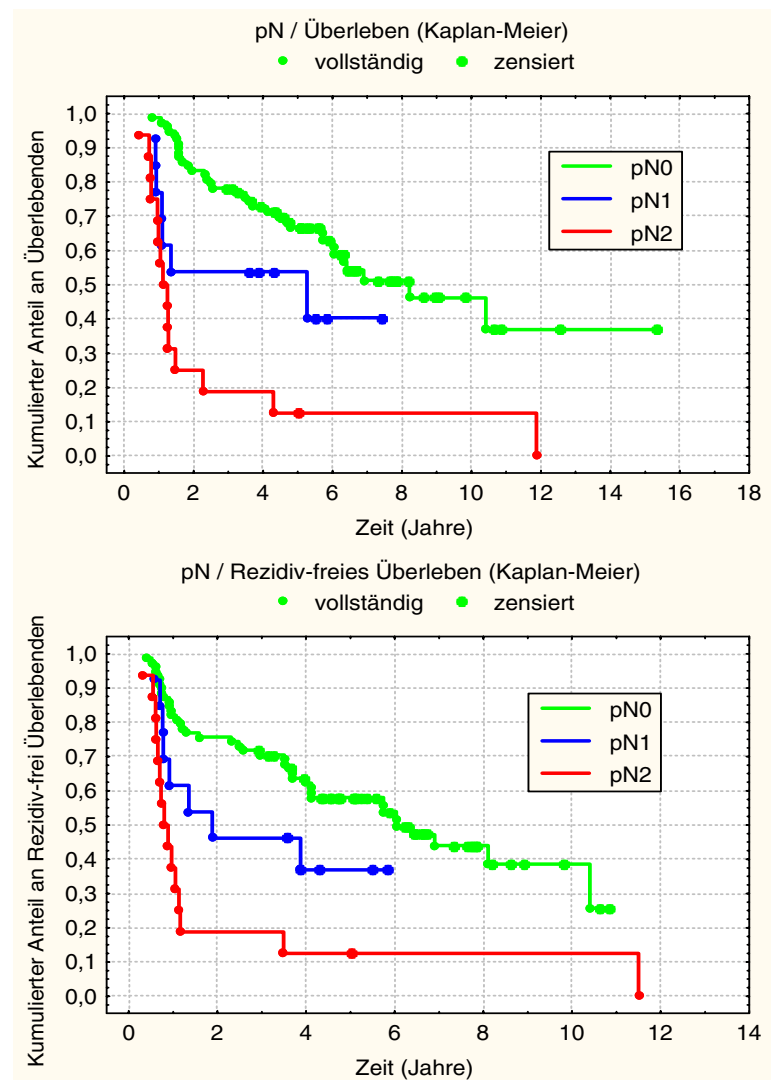


Abb. 17: Die Lymphknotenmetastasierung zeigte einen signifikanten Einfluß auf das Überleben ($p < 0,001$) und Rezidiv-freie Überleben ($p < 0,001$) der Patienten (Kaplan-Meier).

2.3.2 Grading

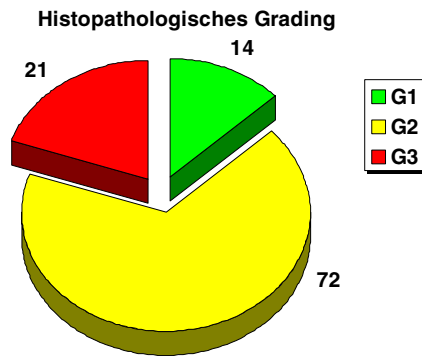


Abb. 18: Histopathologisches Grading der Primärtumoren.

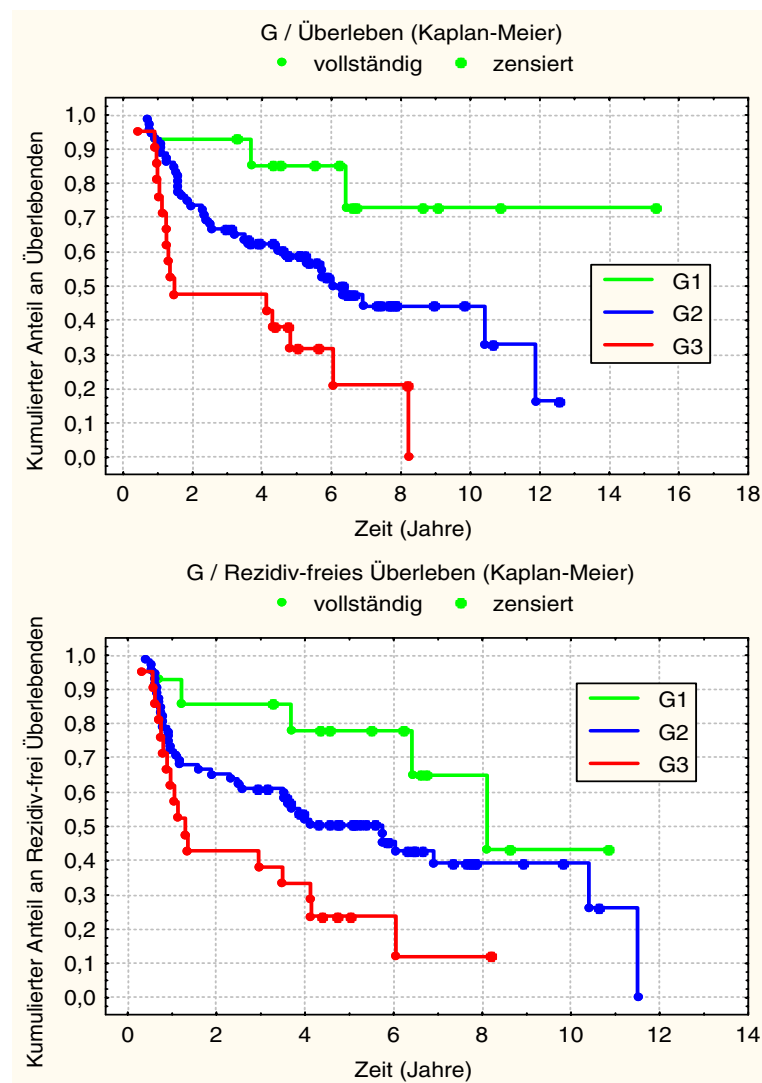


Abb. 19: Das histopathologische Grading zeigte einen signifikanten Einfluß auf das Überleben ($p < 0,01$) und Rezidiv-freie Überleben ($p < 0,02$) der Patienten (Kaplan-Meier).

Beim histopathologischen Grading wurden die meisten Tumoren als mäßig differenziert (G2, Epithelperlen selten, wenig deutliche Keratinisierung von Einzelzellen, seltenes Vorkommen von Interzellularbrücken, 2-4 Mitosen pro Gesichtsfeld bei starker Vergrößerung mit gelegentlichen atypischen Mitosen, mäßige Zell- und Kernpleomorphie, vielkernige Riesenzellen selten) eingestuft (Abb. 18) [210, 245]. Gut oder hoch differenzierte Tumoren (G1, zahlreiche Epithelperlen, erhebliche Keratinisierung der Zellen mit Interzellularbrücken, weniger als 2 Mitosen pro Ge-

sichtsfeld bei starker Vergrößerung, atypische Mitosen und vielkernige Riesenzellen sehr selten, minimale Zell- und Kernpleomorphie) und schlecht oder gering differenzierte Tumoren (G3, Epithelperlen selten oder fehlend, fast keine Keratinisierung der Zellen und keine Interzellularbrücken, mehr als 4 Mitosen pro Gesichtsfeld bei starker Vergrößerung mit zahlreichen atypischen Mitosen, deutliche Zell- und Kernpleomorphie, zahlreiche vielkernige Riesenzellen) waren deutlich seltener, undifferenzierte Tumoren (G4) gar nicht vorhanden. Das histopathologische Grading zeigte einen signifikanten Einfluß sowohl auf das Überleben (Abb. 19, $p < 0,01$) als auch auf das Rezidiv-freie Überleben ($p < 0,02$) der Patienten nach Kaplan und Meier (Abschnitt 3.4).

2.3.3 Stadieneinteilung

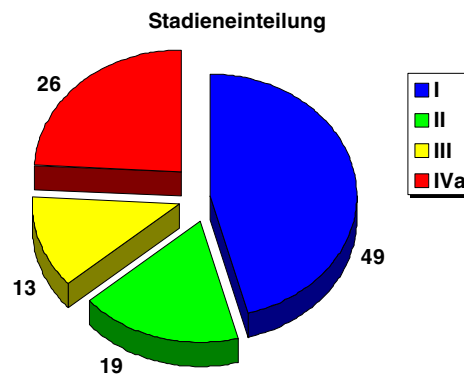


Abb. 20: Eingruppierung der Patienten in Tumorstadien.

Aus der TNM-Klassifikation ergab sich eine Zuordnung der Patienten zu Tumorstadien (Abb. 20) [245]. Die Patienten mit den pT1-Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen (pN0) waren dabei dem Stadium I, Patienten mit pT2-Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen (pN0) dem Stadium II, Patienten mit pT3-Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen (pN0) oder pT1-, pT2- oder pT3-Tumoren mit einem Lymphknotenstatus pN1 dem Stadium III und Patienten mit pT4-Tumoren oder Tumoren mit pN2b- oder pN2c-Lymphknotenmetastasen dem Stadium IVa zuzuordnen. Das Stadium IVb (Lymphknotenstatus pN3) war ebenso wie das definitionsgemäß ausgeschlossene Stadium IVc (Vorliegen von Fernmetastasen = M1) nicht vertreten. Die Stadieneinteilung der Tumoren zeigte einen signifikanten Einfluß sowohl auf das Überleben (Abb. 21, $p < 0,001$) als auch auf das Rezidiv-freie Überleben ($p < 0,001$) der Patienten nach Kaplan und Meier (Abschnitt 3.4).

2.3.4 Dysplasiegrade im Epithel

Bei 93 Patienten war in den Präparaten der Primärtumoren zusätzlich Mundschleimhautepithel außerhalb des infiltrierend wachsenden Tumorgewebes miterfaßt worden. In über der Hälfte der Fälle waren hier keine Dysplasien erkennbar (Grad 0, intaktes Plattenepithel der Schleimhaut, Abb. 22) [210]. In den anderen Fällen waren leichte oder geringe Dysplasien (Grad 1, Verbreiterung der Basalzellschicht = Basalzellenhyperplasie, intakte Schichtung der oberen Zellagen, geringgradige Zell- und Kernpolymorphie), mäßige oder mittelgradige Dysplasien (Grad 2, Übergreifen der vermehrten Basalzellen auf die mittlere Epithelschicht, deutliche Zell- und Kernpolymorphie, Mitosen und auch einzelne atypische Kernteilungsfiguren in der basalen und mittleren Zellschicht) und schwere oder hochgradige Dysplasien (Grad 3, Epithelschichtung fast völlig aufgehoben, nur die oberflächliche Zellschicht noch etwas abgeflacht, ausgeprägte Zell- und Kernpolymorphie, zahlreiche typische und atypische Mitosen im gesamten Epithel) zu beobachten. Die Übergänge von der schweren oder hochgradigen Dysplasie zum Carcinoma in situ, das sich vom eigentlichen Karzinom nur durch das fehlende invasive Wachstum bei intakter Basalmembran unterscheidet, sind hierbei fließend (Abb. 8).

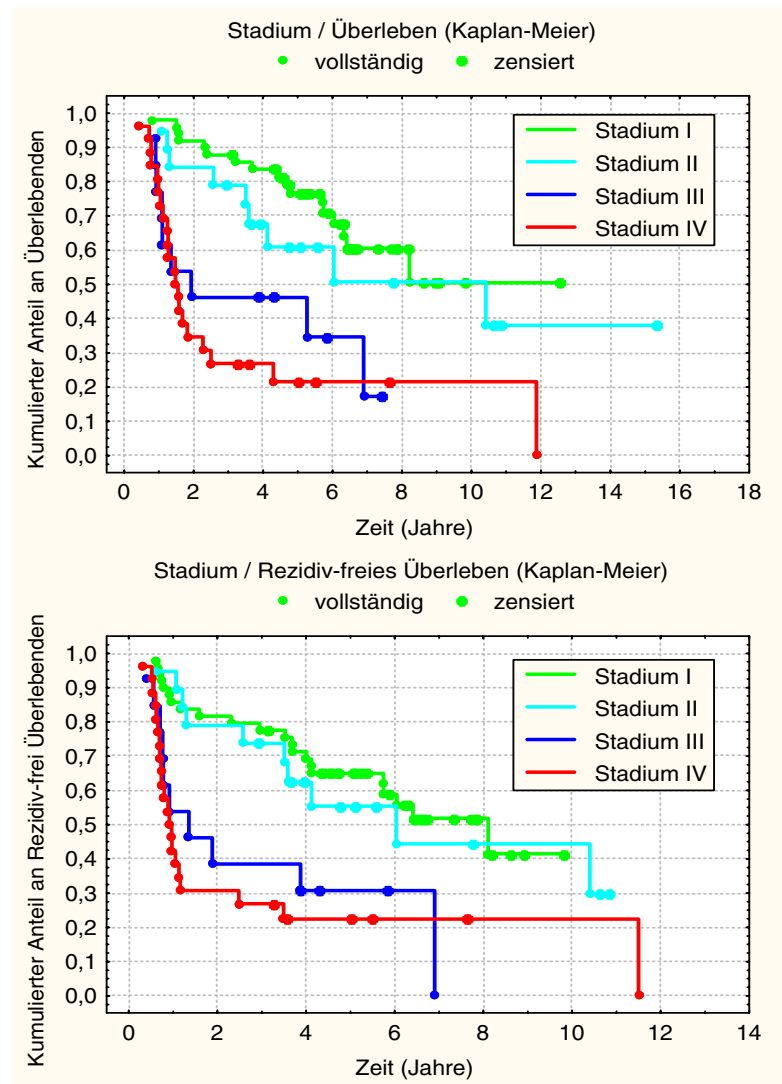


Abb. 21: Die Eingruppierung der Patienten in Tumorstadien zeigte einen signifikanten Einfluß auf das Überleben ($p < 0,001$) und Rezidiv-freies Überleben ($p < 0,001$) der Patienten (Kaplan-Meier).

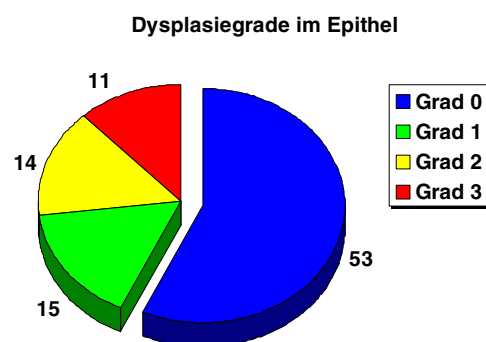


Abb. 22: Maximale Dysplasiegrade im Epithel außerhalb des infiltrierend wachsenden Tumorgewebes bei den 93 Patienten, bei denen entsprechendes Epithel in den Präparaten miterfaßt war.

3 Material und Methoden

3.1 Histologische Präparate

Alle Schritte der nachfolgend beschriebenen Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Puffer- und Substratlösungen wurden unmittelbar vor ihrem Einsatz bei Raumtemperatur hergestellt und aufbewahrt. Vor Auffüllung auf das Gesamtvolumen mit Aqua destillata wurde der pH-Wert mit 1 M Natronlauge oder Salzsäure (Merck, Darmstadt) auf den jeweils angegebenen Wert eingestellt. Zur Kontrolle der Reliabilität der Methoden wurden in jedem Testansatz 5 Gewebsschnitte von Paraffinblöcken mitgeführt, die bereits vorher getestet worden waren, und auf Gleichheit überprüft.

Das hier untersuchte Gewebe war direkt postoperativ routinemäßig in Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Analysiert wurde insgesamt Gewebe aus 156 Paraffinblöcken von 107 Patienten (Tab. 2). Nach Aufsuchen des Tumorgewebes in den Primärtumorsektaten sowie in den suprahyoidalen und infrahyoidalen Blockresektaten mit Hilfe der vorhandenen, routinemäßig angefertigten, mit Haematoxylin und Eosin gefärbten Schnitte wurden von den entsprechenden auf 4°C gekühlten Paraffinblöcken 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden nach Streckung auf der Oberfläche von 50°C warmem, destilliertem Wasser auf Super-Frost/Plus Objektträger (Menzel, Braunschweig) aufgezogen. Es schlossen sich eine Trocknung der Schnitte für 2 h bei Raumtemperatur und eine Inkubation für wiederum 2 h bei 56°C in vertikaler Lage an, um das überschüssige Paraffin zu entfernen. Das restliche Paraffin wurde durch Inkubation der Schnitte in Xylol für zweimal 15 min herausgelöst. Es folgte eine Rehydrierung für jeweils 5 min in Isopropanol, 100% Äthanol, 96% Äthanol, 70% Äthanol und Aqua destillata.

Tab. 2: Verteilung der in unterschiedlicher Anzahl vorhandenen, insgesamt 156 Paraffinblöcke von Primärtumoren und zugehörigen Lymphknotenmetastasen von 107 Patienten.

Fallzahl/Anzahl der vorhandenen Paraffinblöcke:

Lymphknoten- metastasen	Primärtumoren			Summe
	1	2	3	
0	68	23	7	98
1	7	0	0	7
2	1	1	0	2
Summe	76	24	7	107

3.2 Immunhistologische Nachweismethoden

3.2.1 P53

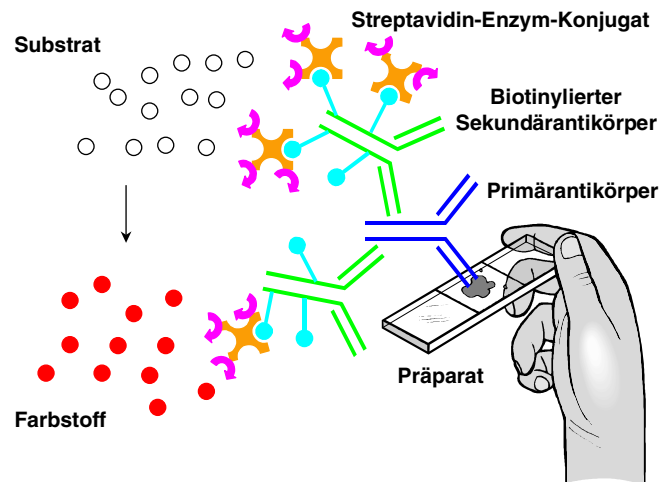


Abb. 23: Immunhistologischer Nachweis eines Antigens im histologischen Gewebspräparat nach der Biotin-Streptavidin-Amplified-Methode (BSA). Nach Freilegung der antigenen Determinanten des nachzuweisenden Antigens erfolgt zuerst die Bindung eines Primärantikörpers an das Antigen. Der Nachweis dieses Antikörpers wird mit einem weiteren, gegen den Primärantikörper gerichteten biotinylierten Antikörper durchgeführt. An das Biotin bindet sich Streptavidin, das vier hochaffine Bindungsstellen für Biotin besitzt (Dissoziationskonstante = 10-15 M) und mit einem Enzym konjugiert ist. Durch dieses Enzym wird abschließend ein farbloses, wasserlösliches Chromogen und Substrat in einen wasserunlöslichen Farbstoff umgesetzt.

Zur Demaskierung der antigenen Determinanten wurden die Gewebsschnitte für 20 min bei 120°C und 1,5 bar Überdruck in 10 mM Citrat-Puffer (2,1 g Zitronensäure-Monohydrat, Merck, Darmstadt; 26 ml 1 M Natronlauge, Merck, Darmstadt; ad 1000 ml; pH=6,0) autoklaviert (Autoklav, Webeco, Bad Schwartau) [208]. Nach Abkühlung der Schnitte auf Raumtemperatur erfolgte eine dreimalige Spülung in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS: 8,5 g Natriumchlorid, Merck, Darmstadt; 1,27 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Merck, Darmstadt; 0,39 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Merck, Darmstadt; ad 1000 ml; pH=7,6) für je 5 min. Der verwendete Primärantikörper p53 (Ab-6), OP43, Klon DO-1 war ein muriner monoklonaler IgG2a-Antikörper von der Firma Oncogene Science, Cambridge, USA, der die Aminosäuren 21-25 in der aminoterminalen Region von p53 detektiert, und wurde in einer Verdünnung von 1:10 in PBS unter Zusatz von 1% Rinderserum-Albumin (Sigma, St. Louis, USA) eingesetzt [282]. Je 100 µl dieser Antikörper-Verdünnung wurden auf die Gewebsschnitte aufgebracht und für 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert (Abb. 23). Negativkontrollen erhielten nur PBS mit 1% Rinderserum-Albumin ohne Antikörper. Es folgte eine dreimalige Spülung der Objektträger in PBS für je 5 min. Anschließend wurden je 100 µl MultiLink aus dem Super Sensitive MultiLink Immunodetection System (BioGenex, San Ramon, USA), das einen biotinylierten anti-Maus-IgG-Antikörper enthält, auf die Gewebsschnitte aufgebracht und für 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaliger Spülung der Objektträger in PBS für je 5 min wurden je 100 µl Label aus dem Super Sensitive MultiLink Immunodetection System (BioGenex, San Ramon, USA), das an Streptavidin gebundene alkalische Phosphatase enthält, auf die Gewebsschnitte aufgebracht und für 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Es folgte wiederum eine dreimalige Spülung der Objektträger in PBS für je 5 min. Anschließend wurden je 200 µl Substrat und Chromogen (1 Tablette Tris-Puffer, Sigma, St. Louis, USA; 1 Tablette Fast Red TR/Naphtol AS-MX Phosphate, Sigma, St. Louis, USA; ad 10 ml; Filtrieren durch ein 0,22 µm Filter, Millex-GV 25 mm, Millipore, Eschborn) über die Gewebsschnitte geschichtet und für 25 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden nachfolgend für 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült, 3 min in Mayers Hämalaun (1,0 g Hämatoxylin, Merck, Darmstadt; 0,2 g Natriumjodat, Merck, Darmstadt; 50,0 g Kaliumalaun, Merck, Darmstadt; 50,0 g Chloralhydrat, Merck, Darmstadt; 1,0 g Zitronensäure-Monohydrat, Merck, Darmstadt; ad 1000 ml) gegengefärbt und wiederum für 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Abschließend wurden jeweils etwa 200 µl Kaisers Glyceringelatine für

die Mikroskopie (Merck, Darmstadt), die im Mikrowellenherd auf 50°C erwärmt worden war, über die Gewebsschnitte geschichtet und je ein Deckglas (Menzel, Braunschweig) aufgebracht.

Die Auswertung der immunhistologisch gefärbten Schnitte erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Leitz Laborlux 12, Leitz, Wetzlar). Zunächst wurde bei Lupenvergrößerung (25x) das Tumorgewebe aufgesucht, das den höchsten Anteil an rot gefärbten Zellkernen enthielt. Anschließend wurde in diesem Areal ausgehend von der Tumorfront bei höherer Vergrößerung (100x) der Anteil der rot angefärbten Zellkerne relativ zur Gesamtzahl von 500 Zellkernen ausgezählt. Die Bewertung der immunhistologischen Reaktion war negativ, wenn keine Zellkerne rot angefärbt waren, und wurde im übrigen in drei weitere Gruppen eingeteilt: In der ersten waren weniger als ein Drittel, in der zweiten mindestens ein Drittel, aber weniger als zwei Drittel und in der dritten mindestens zwei Drittel der Zellkerne positiv. Eine intraindividuelle Heterogenität wurde dann angenommen, wenn sich die Bewertung der immunhistologischen Reaktion in den vorhandenen Gewebsschnitten von unterschiedlichen Paraffinblöcken eines Patienten um mindestens zwei Eingruppierungen unterschied.

Die immunhistologische Reaktion im epithelialen Gewebe außerhalb des infiltrierenden Tumors wurde bestimmt, indem der Teil des auf den Schnitten miterfaßten Epithels außerhalb des infiltrierend wachsenden Tumors aufgesucht wurde, der den höchsten Dysplasiegrad aufwies. Als negativ wurde die immunhistologische Reaktion bei fehlender roter Anfärbung und als positiv bei roter Anfärbung der Zellkerne in dem umschriebenen Areal, das den höchsten Dysplasiegrad aufwies, bewertet.

3.2.2 P90^{MDM2}

Sowohl der immunhistologische Nachweis von p90^{MDM2} im Tumorgewebe und Epithel als auch die Auswertung der Präparate wurden in identischer Weise wie bei dem Nachweis von p53 (Abschnitt 3.2.1) durchgeführt. Als Primärantikörper diente hier allerdings der murine monoklonale IgG2b-Antikörper MDM2 (Ab-1), OP46, Klon IF2 der Firma Oncogene Science, Cambridge, USA, der ein Epitop in der aminoterminalen Region um die Aminosäure 491 von p90^{MDM2} detektiert, in einer Verdünnung von 1:10 in PBS unter Zusatz von 1% Rinderserum-Albumin.

3.2.3 P21^{CIP}

Auch für den immunhistologischen Nachweis von p21^{CIP} im Tumorgewebe und im Epithel wie auch für die Auswertung der Präparate war die Methodik identisch zum Nachweis von p53 (Abschnitt 3.2.1). Als Primärantikörper diente hier der murine monoklonale IgG1-Antikörper WAF1 (Ab-1), OP64, Klon EA10 der Firma Oncogene Science, Cambridge, USA, der in einer Verdünnung von 1:20 in PBS unter Zusatz von 1% Rinderserum-Albumin eingesetzt wurde.

3.2.4 P16^{INK4a}

Beim immunhistologischen Nachweis von p16^{INK4a} wurden die Gewebsschnitte nach Entparaffinierung zunächst für 10 min in Tris-Puffer (8,78 g Natriumchlorid, Merck, Darmstadt; 6,85 g Tris HCl, Merck, Darmstadt; 0,9 g Tris Base, Merck, Darmstadt; ad 1000 ml; pH=7,4) und anschließend für 20 min in 3,5% Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt) in Tris-Puffer zur Blockierung von endogener Peroxidase sowie für 40 min in 20% normalem Ziegen Serum (Seromed, Biochrom, Berlin) in Tris-Puffer zur Blockierung von unspezifischen Reaktionen inkubiert. Als Primärantikörper für den immunhistologischen Nachweis von p16^{INK4a} diente der murine monoklonale IgG1-Antikörper 13521A, Klon G175-405 der Firma PharMingen, San Diego, USA in einer Verdünnung von 1:30 in 20% normalem Ziegen Serum in Tris-Puffer und als Negativkontrolle 20% normales Ziegen Serum in Tris-Puffer ohne Antikörper. Nach Inkubation der Gewebsschnitte mit dieser Primärantikörper-Lösung für 22 h bei 4°C und für 1 h bei Raumtemperatur in einer dunklen feuchten Kammer erfolgte eine zweimalige Spülung für 5 min mit Tris-Puffer. Anschließend wurden je 100 µl MultiLink aus dem Universal-LSAB-Plus-HRP-Kit (DAKO, Glostrup, Dänemark), das einen biotinylierten anti-Maus-IgG-Antikörper enthält, auf die Gewebsschnitte aufgebracht und für 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaliger Spülung der Objektträger in Tris-Puffer für je 5 min wurden je 100 µl Streptavidin-Komplex aus dem Universal-LSAB-Plus-HRP-Kit (DAKO, Glostrup, Dänemark), das an Streptavidin gebundene Peroxidase enthält, auf die Gewebsschnitte aufgebracht und für 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten mit Tris-Puffer für je 5 min wurden je 200 µl von einer 0,05% Diaminobenzidin-Lösung (Sigma, St. Louis, USA) versetzt mit 0,02% Wasserstoffperoxid über jeden Gewebsschnitt geschichtet. Nach 6 min wurden die Gewebsschnitte in destilliertes Wasser transferiert, dreimal gewaschen, mit Mayers Hämalaun für

3 min gegengefärbt und mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt (Abschnitt 3.2.1). Die Auswertung der Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen im Tumorgewebe entsprach dem Vorgehen beim Nachweis von p53 (Abschnitt 3.2.1) mit dem Unterschied, daß die positiven Zellkerne hier braun angefärbt waren.

3.2.5 Cyclin D1

Beim immunhistologischen Nachweis von Cyclin D1 wurden die Gewebsschnitte zur Demaskierung der antigenen Determinanten dreimal für 5 min bei 600 W im Mikrowellenherd (Panasonic, Berlin) in Target Retrieval Solution 9 (TRS 9, DAKO, Glostrup, Dänemark) inkubiert. Nach einer Abkühlungsphase für 20 min folgten Inkubationen für 10 min in 3,0% Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt) in Tris-Puffer zur Blockierung von endogener Peroxidase und nach zwei je 5 min dauernden Waschgängen mit Tris-Puffer für 10 min in Blocking-Reagent aus dem Universal-LSAB-Peroxidase-Kit (DAKO, Glostrup, Dänemark) zur Blockierung von unspezifischen Reaktionen. Als Primärantikörper für den immunhistologischen Nachweis von Cyclin D1 wurde der murine monoklonale IgG2a-Antikörper 18-0220, Klon Am29, der von der Firma Zymed, San Francisco, USA bezogen wurde, in einer Verdünnung von 1:80 in DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO, Glostrup, Dänemark) und als Negativkontrolle diese Antikörper-Verdünnungslösung ohne Antikörperzusatz verwendet. Nach Inkubation der Gewebsschnitte mit dieser Primärantikörper-Lösung für 1 h in einer dunklen feuchten Kammer erfolgte eine zweimalige Spülung für 5 min mit Tris-Puffer. Anschließend wurden je 100 µl Link aus dem Universal-LSAB-Peroxidase-Kit (DAKO, Glostrup, Dänemark), das einen biotinylierten anti-Maus-IgG-Antikörper enthält, auf die Gewebsschnitte aufgebracht und für 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaliger Spülung der Objektträger in Tris-Puffer für je 5 min wurden je 100 µl Streptavidin-Peroxidase-Komplex aus dem Universal-LSAB-Peroxidase-Kit (DAKO, Glostrup, Dänemark), das an Streptavidin gebundene Peroxidase enthält, auf die Gewebsschnitte aufgebracht und für 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten mit Tris-Puffer für je 5 min wurden je 200 µl von einer 3-Amino-9-äthylcarbazol-Lösung (AEC-Lösung: 20 mg AEC, Sigma, St. Louis, USA; 12 ml Dimethylsulfoxid, Sigma, St. Louis, USA; ad 100 ml mit PBS, pH=5,3; ad 200 ml mit Aqua destillata) versetzt mit 0,02% Wasserstoffperoxid über jeden Gewebsschnitt geschichtet. Nach 10 min wurden die Gewebsschnitte in destilliertes Wasser transferiert, dreimal gewaschen, mit Mayers Hämalaun für 3 min gegengefärbt und mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt (Abschnitt 3.2.1). Die Auswertung der Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen im Tumorgewebe entsprach dem Vorgehen beim Nachweis von p53 (Abschnitt 3.2.1).

3.2.6 PRB

Der immunhistologische Nachweis von pRB im Tumorgewebe und die Auswertung der Präparate wurden wiederum in identischer Weise wie der Nachweis von p53 (Abschnitt 3.2.1) durchgeführt. Als Primärantikörper wurde der murine monoklonale IgG1-Antikörper MU2900396, Klon G3-245 der Firma BioGenex, San Ramon, USA, der ein Epitop in der Region der Aminosäuren 300 bis 380 von pRB erkennt, in einer Verdünnung von 1:20 in PBS unter Zusatz von 1% Rinderserum-Albumin verwendet. Vor Einsatz dieser Antikörper-Verdünnung erfolgte eine Blockierung unspezifischer Reaktionen durch Inkubation der Gewebsschnitte in Power Block Universal Blocking Reagent (BioGenex, San Ramon, USA) für 20 min.

3.2.7 BCL-2

Auch das immunhistologische Nachweisverfahren von BCL-2 im Tumorgewebe war identisch zum Nachweis von p53 (Abschnitt 3.2.1). Als Primärantikörper diente hier der murine monoklonale IgG1-Antikörper M 887, Klon 124 der Firma DAKO, Glostrup, Dänemark in einer Verdünnung von 1:10 in PBS unter Zusatz von 1% Rinderserum-Albumin [206]. Bei der Auswertung der immunhistologischen Färbungen wurde ausgehend von der Tumorfront bei einer 100x-Vergrößerung der Anteil der im Zytoplasma rot angefärbten Zellen relativ zur Gesamtzahl von 500 Zellen ausgezählt. Dabei dienten Lymphozyten als interne positive Kontrolle, die ausnahmslos auf allen Gewebsschnitten vorhanden waren. Tumorzellen, deren zytoplasmatische Rotfärbung wenigstens die Hälfte der Intensität der Rotfärbung der Lymphozyten aufwies, wurden hierbei als positiv, die anderen als negativ angesehen. Letztlich wurden die Anteile der positiven Zellen wiederum in drei Gruppen zusätzlich zu einem komplett negativen Ergebnis eingeteilt: In der ersten waren weniger als ein Drittel, in der zweiten mindestens ein Drittel, aber weniger als zwei Drittel und in der dritten mindestens zwei Drittel der Zellen im Zytoplasma positiv.

3.2.8 BAX

Beim immunhistologischen Nachweis von BAX wurden die Gewebsschnitte zur Demaskierung der antigenen Determinanten dreimal für 10 min bei 600 W im Mikrowellenherd in TRS 9 (DAKO, Glostrup, Dänemark) inkubiert. Nach einer Abkühlungsphase für 20 min folgten Inkubationen für 10 min in 3,0% Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt) in Tris-Puffer zur Blockierung von endogener Peroxidase und nach zwei je 5 min dauernden Waschgängen mit Tris-Puffer für 20 min in Power Block Universal Blocking Reagent (BioGenex, San Ramon, USA) zur Blockierung von unspezifischen Reaktionen. Als Primärantikörper für den immunhistologischen Nachweis von BAX wurde der murine monoklonale IgG1-Antikörper 18-0218, Klon 2D2 von der Firma Zymed, San Francisco, USA in einer Verdünnung von 1:150 in DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO, Glostrup, Dänemark) und als Negativkontrolle diese Antikörper-Verdünnungslösung ohne Antikörperzusatz verwendet. Nach Inkubation der Gewebsschnitte mit dieser Primärantikörper-Lösung für 1 h in einer dunklen feuchten Kammer erfolgte eine zweimalige Spülung für 5 min mit Tris-Puffer. Anschließend wurden je 100 µl biotinyliated secondary antibody solution aus dem Vectastain Universal Elite ABC-Kit (Vector, Burlingame, USA), das einen biotinylierten anti-Maus-IgG-Antikörper enthält, auf die Gewebsschnitte aufgebracht und für 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaliger Spülung der Objektträger in Tris-Puffer für je 5 min wurden je 100 µl Vectastain Elite ABC Reagent aus dem Vectastain Universal Elite ABC-Kit (Vector, Burlingame, USA), das an Avidin gebundene Peroxidase enthält, auf die Gewebsschnitte aufgebracht und für 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten mit Tris-Puffer für je 5 min wurden je 200 µl von einer 3-Amino-9-äthylcarbazol-Lösung (AEC-Lösung: 20 mg AEC, Sigma, St. Louis, USA; 12 ml Dimethylsulfoxid, Sigma, St. Louis, USA; ad 100 ml mit PBS, pH=5,3; ad 200 ml mit Aqua destillata) versetzt mit 0,02% Wasserstoffperoxid über jeden Gewebsschnitt geschichtet. Nach 10 min wurden die Gewebsschnitte in destilliertes Wasser transferiert, dreimal gewaschen, mit Mayers Hämalun für 3 min gegengefärbt und mit Kaisers Glycingelatine eingedeckt (Abschnitt 3.2.1). Die Auswertung der Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen im Tumorgewebe entsprach dem Vorgehen beim Nachweis von BCL-2 (Abschnitt 3.2.7).

3.2.9 E-Cadherin

Die Demaskierung von antigenen Determinanten zum Nachweis von E-Cadherin erfolgte durch dreimalige Inkubation der Gewebsschnitte für 10 min bei 600 W in Urea-Puffer (240,2 g Urea, Sigma, St. Louis, USA; ad 1000 ml mit PBS; pH=7,6) im Mikrowellenherd. Nach Abkühlung der Schnitte auf Raumtemperatur schloß sich eine dreimalige Spülung in Tris-Puffer für je 5 min, Blockierung von endogener Peroxidase durch Inkubation in 3,0% Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt) in Tris-Puffer für 10 min gefolgt von zwei weiteren Waschschritten mit Tris-Puffer an. Als Primärantikörper wurde der murine monoklonale IgG1-Antikörper PC10028, Klon 5H9 von der Firma Progen Biotechnik, Heidelberg in einer Verdünnung von 1:5 in Tris-Puffer eingesetzt. Je 100 µl dieser Antikörper-Verdünnung wurden auf die Gewebsschnitte aufgebracht und für 22 h in einer dunklen, feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Negativkontrollen erhielten nur Tris-Puffer ohne Antikörper. Es folgte eine dreimalige Spülung der Objektträger mit Tris-Brij-Lösung (1,25 ml Brij 35 Solution 30%, Sigma, St. Louis, USA; ad 1000 ml mit Tris-Puffer; pH=7,4) für je 5 min. Anschließend wurden je 100 µl MultiLink aus dem Universal-LSAB-Plus-HRP-Kit (DAKO, Glostrup, Dänemark), das einen biotinylierten anti-Maus-IgG-Antikörper enthält, auf die Gewebsschnitte aufgebracht und für 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaliger Spülung der Objektträger in Tris-Brij-Lösung für je 5 min wurden je 100 µl Streptavidin-Komplex aus dem Universal-LSAB-Plus-HRP-Kit (DAKO, Glostrup, Dänemark), das an Streptavidin gebundene Peroxidase enthält, auf die Gewebsschnitte aufgebracht und für 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit Tris-Brij-Lösung für je 5 min wurden je 200 µl von einer 0,05% Diaminobenzidin-Lösung (Sigma, St. Louis, USA) versetzt mit 0,02% Wasserstoffperoxid über jeden Gewebsschnitt geschichtet. Nach 6 min wurden die Gewebsschnitte in destilliertes Wasser transferiert, dreimal gewaschen, mit Mayers Hämalun für 3 min gegengefärbt und mit Kaisers Glycingelatine eingedeckt (Abschnitt 3.2.1).

Zur Auswertung der immunhistologischen Färbungen wurden die Tumorzellen bei einer 100x-Vergrößerung beurteilt, wobei das Epithelgewebe außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes als interne positive Kontrolle diente. Fälle, bei denen auf den Gewebsschnitten der Primärtumoren kein solches Epithelgewebe vorhanden war, wurden von dieser Untersuchung ausgeschlossen. Beurteilt wurde, ob die Tumorzellen dabei entweder eine ausschließlich oder

zumindest überwiegend (Mindestverhältnis der Färbungsintensitäten = 2:1) membranöse Färbung, eine ausschließlich oder zumindest überwiegend (Mindestverhältnis der Färbungsintensitäten = 2:1) zytoplasmatische Färbung oder eine positive Färbung ohne diese Intensitätsunterschiede im Membranbereich und im Zytoplasma zeigten oder komplett negativ waren.

3.2.10 CD44

Zur Detektion von Spleiß-Varianten des CD44, die die durch die varianten Exons V4, V5, V6 und V7 kodierten Epitope enthalten, wurde das immunhistologische Nachweisverfahren wie zum Nachweis von p53 (Abschnitt 3.2.1) eingesetzt. Als Primärantikörper dienten hier murine monoklonale IgG1-Antikörper der Firma Bender MedSystems, Wien, Österreich in PBS unter Zusatz von 1% Rinderserum-Albumin: Antikörper gegen CD44v4, BMS114, Klon VFF-11 in einer Verdünnung von 1:40, Antikörper gegen CD44v5, BMS115, Klon VFF-8 in einer Verdünnung von 1:80, Antikörper gegen CD44v6, BMS125, Klon VFF-18 in einer Verdünnung von 1:100 und Antikörper gegen CD44v7, BMS117, Klon VFF-9 in einer Verdünnung von 1:20.

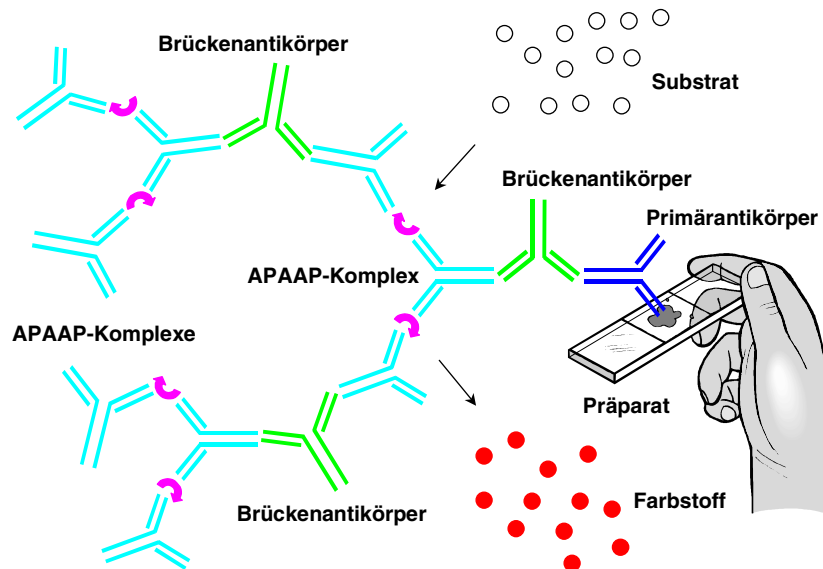


Abb. 24: Immunhistologischer Nachweis eines Antigens im histologischen Gewebspräparat nach der alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP). Nach Freilegung der antigenen Determinanten des nachzuweisenden Antigens erfolgt zuerst die Bindung eines murinen Primärantikörpers an das Antigen. Ein gegen murine Antikörper gerichteter Brückenantikörper bildet die Verbindung zu einem murinen anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper, der wiederum an die alkalische Phosphatase bindet (APAAP-Komplex). Es folgt ein weiterer anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper, ein Brückenantikörper und ein weiterer APAAP-Komplex. Durch die alkalische Phosphatase wird abschließend ein farbloser, wasserlösliches Chromogen und Substrat in einen wasserunlöslichen Farbstoff umgesetzt.

Der Nachweis der Isoform CD44v9 erfolgte mit Hilfe einer doppelten alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase-Technik (APAAP, Abb. 24) [43]: Zur Demaskierung der antigenen Determinanten wurden die Gewebsschnitte für 10 min bei 120°C und 1,5 bar Überdruck in 10 mM Citrat-Puffer autoklaviert (Abschnitt 3.2.1) [208]. Nach Abkühlung der Schnitte auf Raumtemperatur erfolgte eine dreimalige Spülung in PBS für je 5 min. Der verwendete Primärantikörper wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. H.-J. Terpe, Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie, Westfälische-Wilhelms-Universität Münster zur Verfügung gestellt. Je 100 µl einer Lösung dieses murinen monoklonalen Antikörpers in einer Verdünnung von 1:80 in RPMI-1640-Medium (100 ml RPMI-1640-Konzentrat, Seromed, Biochrom, Berlin; 1 g Natriumazid, Merck, Darmstadt; ad 1000 ml; pH=7,4) versetzt mit 10% inaktiviertem Rinderserum (Seromed, Biochrom, Berlin) wurden über die Gewebsschnitte geschichtet und für 1 h in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaliger Spülung in Tris-Puffer für je 5 min wurden die Gewebsschnitte mit je 100 µl einer Lösung aus anti-Maus-Immunglobulin-Antikörpern vom Kaninchen (Z 259, DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:25 in RPMI-Medium mit 10% inaktiviertem Rinderserum als Brückenantikörper für 30 min inkubiert. Nach erneuter dreimaliger Spülung in Tris Puffer für je 5 min folgte eine Inkubation der Gewebsschnitte für 30 min mit je 100 µl einer Lösung aus APAAP-Komplexen (D 651, DAKO, Glostrup, Dänemark), die aus murinen

monoklonalen Antikörpern gegen alkalische Phosphatase (Klon AP7/6/7) und alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm bestehen, in einer Verdünnung von 1:50 in RPMI-Medium mit 10% inaktiviertem Rinderserum. Die Inkubationsschritte mit dem Brückenantikörper und den APAAP-Komplexen wurden anschließend einmal wiederholt. Es folgte wiederum eine dreimalige Spülung der Objektträger in Tris-Puffer für je 5 min. Anschließend wurden je 200 µl Substrat und Chromogen (1 Tablette Tris-Puffer, Sigma, St. Louis, USA; 1 Tablette Fast Red TR/Naphtol AS-MX Phosphate, Sigma, St. Louis, USA; ad 10 ml; Filtrieren durch ein 0,22 µm Filter, Millex-GV 25 mm, Millipore, Eschborn) auf die Gewebsschnitte aufgebracht und für 25 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden nachfolgend für 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült, 3 min in Mayers Hämalaun gegengefärbt und mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt (Abschnitt 3.2.1).

Zur Auswertung der immunhistologischen Färbungen wurden die Tumorzellen bei einer 100x-Vergrößerung beurteilt, wobei das Epithelgewebe außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes als interne positive Kontrolle diente. Fälle, bei denen auf den Gewebsschnitten der Primärtumoren kein solches Epithelgewebe vorhanden war, wurden von dieser Untersuchung ausgeschlossen. Der Anteil der Zellen mit rot angefärbten Zellmembranen wurde ausgehend von der Tumorfront durch Auswertung von jeweils 500 Zellen bestimmt. Die Ergebnisse wurden in vier Gruppen eingeteilt: In der ersten betrug der Anteil der positiven Zellen unter 25%, in der zweiten mindestens 25%, aber weniger als 50%, in der dritten mindestens 50%, aber weniger als 75% und in der vierten mindestens 75%. Eine intraindividuelle Heterogenität wurde dann angenommen, wenn sich die Ergebnisse in den vorhandenen Gewebsschnitten von unterschiedlichen Paraffinblöcken eines Patienten um mindestens zwei Eingruppierungen unterschieden. Zur Überlebensstatistik wurden nochmals die ersten beiden und die letzten beiden Gruppen zusammengefaßt, so daß hierbei zwei Gruppen resultierten: In die erste Gruppe wurden die Fälle mit einem Anteil von weniger als 50% positiver Zellen, das heißt einer verminderten CD44-Expression, und in die zweite dementsprechend Fälle mit 50% oder mehr positiven Zellen, was als positive CD44-Expression angesehen wurde, eingeordnet.

3.2.11 Ki-67

Auch für den immunhistologischen Nachweis des Proliferations-assoziierten nukleären Antigens Ki-67 im Tumorgewebe war die Methodik identisch zum Nachweis von p53 (Abschnitt 3.2.1). Als Primärantikörper diente hier der murine monoklonale IgG1-Antikörper dia 505, Klon MIB 1 der Firma Dianova, Hamburg in einer Verdünnung von 1:10 in PBS unter Zusatz von 1% Rinderserum-Albumin [74]. Der Anteil der Zellen mit rot angefärbten Zellkernen wurde ausgehend von der Tumorfront durch Auswertung von jeweils 500 Zellen bestimmt und als Ki-67-Index angegeben, der den prozentualen Anteil an positiven Zellen widerspiegelt. Die Ergebnisse wurden in vier Gruppen eingeteilt: In der ersten betrug der Ki-67-Index unter 25%, in der zweiten mindestens 25%, aber weniger als 50%, in der dritten mindestens 50%, aber weniger als 75% und in der vierten mindestens 75%. Eine intraindividuelle Heterogenität wurde dann angenommen, wenn sich der Ki-67-Index in den vorhandenen Gewebsschnitten von unterschiedlichen Paraffinblöcken eines Patienten um mindestens zwei Eingruppierungen unterschied.

3.3 Apoptosenachweis

DNA-Fragmente in apoptotischen Zellen wurden mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion unter Verwendung des ApopTag-Kit von Oncor, Gaithersburg, USA [3, 72] markiert (Abb. 25): Nach Entparaffinierung und Rehydrierung (Abschnitt 3.1) wurden die Gewebsschnitte für 30 min bei Raumtemperatur in einer 20 mg/l Proteinase-K-Lösung (Sigma, Deisenhofen) in PBS bei pH 7,6 zur Proteinauflösung inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS und Blockierung endogener Peroxidase durch Inkubation in 3,0% Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt) in PBS für 5 min gefolgt von zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Schnitte mit Equilibration-Puffer aus dem ApopTag-Kit für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils 25 µl einer Mischung aus terminaler Transferase-Lösung und Reaktionspuffer aus dem ApopTag-Kit über die Gewebsschnitte geschichtet und diese bei 37°C unter Deckgläsern inkubiert. Negativkontrollen erhielten nur Reaktionspuffer mit destilliertem Wasser anstelle von terminaler Transferase-Lösung. Nach 60 min wurde die enzymatische Reaktion durch Einbringen der Gewebsschnitte in die Blockierungslösung aus dem ApopTag-Kit für 30 min bei 37°C gestoppt. Anschließend wurden die Gewebsschnitte wiederum dreimal mit PBS gewaschen und in einer Lösung aus Peroxidase-konjugierter muriner anti-Digoxigenin-Antikörper-Lösung aus dem ApopTag-Kit für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS wurden je 200 µl von einer 0,05% Diaminobenzidin Lösung (Sigma, St. Louis, USA) versetzt mit 0,02% Wasserstoffperoxid über jeden Gewebsschnitt geschichtet. Nach 6 min wurden die Gewebsschnitte in destilliertes Wasser transferiert, dreimal gewaschen, mit 0,5% Methylgrün (Merck, Darmstadt) gegengefärbt und mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt (Abschnitt 3.2.1).

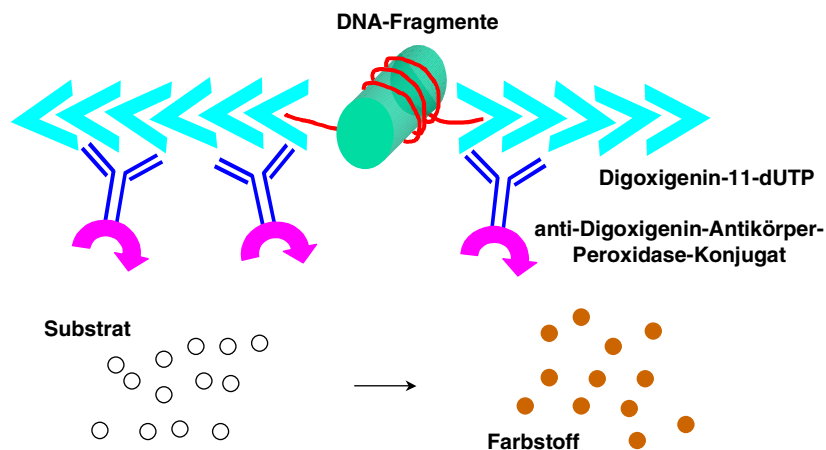


Abb. 25: Die Endprodukte des DNA-Abbaus im Rahmen der Apoptose sind nukleosomale DNA-Fragmente in der Größe von etwa 180 Basenpaaren. Zum Nachweis werden an diese DNA-Fragmente Digoxigenin-markierte Nukleotide enzymatisch mit Hilfe einer terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase-Reaktion, die sequenzunabhängig die Polymerisation von Desoxyribonukleotidtriphosphaten an 3'-OH-Enden von doppel- und einzelsträngiger DNA katalysiert, polymerisiert. Die hier verwendeten Nukleotide bilden ein Heteropolymer aus Digoxigenin-markiertem Desoxyuridintriphosphat (dUTP) und Desoxyadenosin-triphosphat in einer Konformation, die eine Erkennung des Digoxigenins durch anti-Digoxigenin-Antikörper besonders gut zulässt. Diese Antikörper sind mit Peroxidase konjugiert, durch die abschließend ein farbloses, wasserlösliches Chromogen und Substrat in einen wasserunlöslichen Farbstoff umgesetzt wird.

Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde ausgehend von der Tumorfront durch Zählung der braun gefärbten Zellkerne von jeweils 4000 Zellen bestimmt, wobei zusätzlich noch bei höherer Vergrößerung die exakte Morphologie der positiv gefärbten Zellen berücksichtigt wurde (Abb. 6) [111, 131], um falsch positiv gefärbte Zellkerne, Zelltrümmer und Artefakte auszuschließen. Die Apoptoserate wurden als Index angegeben, der den prozentualen Anteil an positiven Zellen widerspiegelt (Apoptose-Index). Die Ergebnisse wurden in vier Gruppen eingeteilt: In der ersten betrug der Apoptose-Index unter 0,5%, in der zweiten mindestens 0,5%, aber weniger als 1,5%, in der dritten mindestens 1,5%, aber weniger als 2,5% und in der vierten mindestens 2,5%. Eine intraindividuelle Heterogenität wurde dann angenommen, wenn sich der Apoptose-Index in den vorhandenen Gewebsschnitten von unterschiedlichen Paraffinblöcken eines Patienten um mindestens zwei Eingruppierungen unterschied.

3.4 Statistische Methoden

Die statistischen Auswertungen wurden computergestützt mit Hilfe des Programms Statistica für Windows 5.1H (StatSoft, Tulsa, USA) unter dem Betriebssystem Windows NT 4.0 (Microsoft, München) auf einem IBM-kompatiblen Personalcomputer mit Intel Pentium-Prozessor durchgeführt. Die Auswertung des Überlebens und Rezidiv-freien Überlebens der Patienten erfolgte univariat nach der Methode von Kaplan und Meier [124]. Zum Vergleich der Überlebenskurven wurde eine Erweiterung von Gehans verallgemeinertem Wilcoxon Test [73] verwendet, wobei zuerst Werte für jede Überlebenszeit nach Mantels Prozedur berechnet [164] und nachfolgend ein Chi-Quadrat-Test mit den Summen aller Werte jeder zu vergleichenden Gruppe durchgeführt wurden. Zur multivariaten Analyse wurde das Proportional-Hazard-Modell nach Cox [45] eingesetzt. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse in allen Testverfahren bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistologische Nachweismethoden

4.1.1 P53

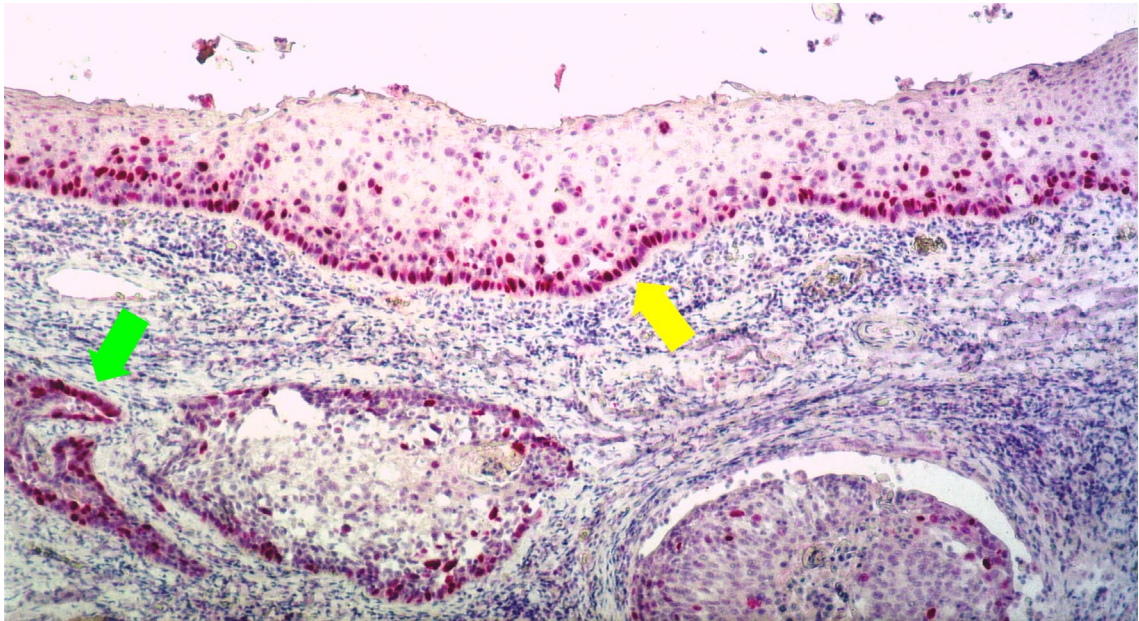


Abb. 26: Der immunhistologische Nachweis von p53 war im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes vorwiegend im dysplastischen Epithel zu finden und beschränkte sich bevorzugt auf das Stratum basale (Gelber Pfeil). Wenn nur ein Teil der Zellkerne im Tumorgewebe positiv reagierte, waren es immer die in den äußeren, weniger ausdifferenzierten Zelllagen, während die inneren, reiferen Zellen negativ waren (Grüner Pfeil). Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: p53, Ab-6, OP43, Klon DO-1 / Chromogen: Fast-Red / Gegenfärbung: Hämalaun); Originalvergrößerung: 100x.

p53 im Epithel / Dysplasiegrad

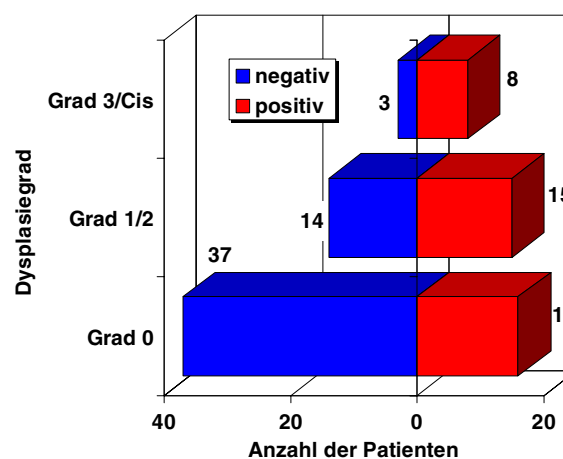


Abb. 27: Zwischen dem höchsten Dysplasiegrad (Cis = Carcinoma in situ) und dem immunhistologischen Nachweis von p53 gab es im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes einen signifikant positiven Zusammenhang (Mann-Whitney U-Test: $p < 0,01$).

Im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes wurden beim immunhistologischen Nachweis von p53 bevorzugt die Zellkerne im Stratum basale positiv angefärbt, während die höheren, weiter ausdifferenzierten Zelllagen meistens negativ waren (Abb. 26). In den Fällen, in denen keine Dysplasien in diesem Epithel erkennbar waren, war p53 in 30,2%, bei einer geringen oder mäßigen Dysplasie in 51,7% und bei einer schweren Dysplasie oder einem Carcinoma in situ in 72,7% der Fälle immunhistologisch im Epithel nachweisbar (Abb. 27). Folglich

besteht eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Dysplasiegrad und dem immunhistologischen Nachweis von p53 im Epithel (Mann-Whitney U-Test: $p < 0,01$) [163]. Eine Abhängigkeit zwischen dem Nachweis von p53 und dem Alkohol- oder Tabakabusus der Patienten ergab sich dagegen hier nicht.

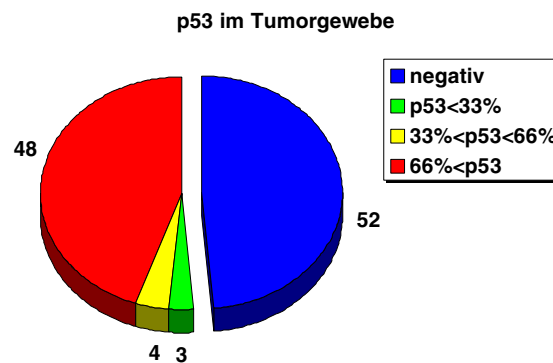


Abb. 28: Der immunhistologische Nachweis von p53 im Tumorgewebe war in 48,6% der Fälle komplett negativ und in 44,9% der Fälle in mindestens zwei Drittel der Tumorzellkerne positiv. Bei 6,5% der Tumoren gab es eine partielle Färbung der Tumorzellkerne.

In etwa der Hälfte der Plattenepithelkarzinome (51,4%) konnte p53 immunhistologisch nachgewiesen werden, wobei meistens alle untersuchten Tumorzellen entweder negativ oder positiv waren (Abb. 28). In den wenigen Fällen (6,5%), in denen p53 nur in einem Teil der Tumorzellen nachweisbar war, war dies gehäuft in den äußeren, weniger ausdifferenzierten Zellagen der Fall, wogegen die inneren, reiferen Zellen der Tumorzellnester negativ waren (Abb. 26). In 4 von 31 Fällen (12,9%), in denen mehrere Blöcke von einzelnen Primärtumoren untersucht werden konnten, gab es Unterschiede von mehr als einer Eingruppierung der immunhistologischen Ergebnisse zwischen den Blöcken als Zeichen einer intratumoralen Heterogenität. Zwischen Primärtumoren und zugehörigen Lymphknotenmetastasen war in 9 Fällen ein Vergleich möglich, wobei nur in einem Fall (11,1%) ein negatives Ergebnis im Primärtumor einem positiven Ergebnis in mindestens einem Drittel, aber weniger als zwei Drittel der Tumorzellkerne im Lymphknoten gegenüberstand. Zwischen verschiedenen Lymphknotenmetastasen ein und desselben Primärtumors gab es in keinem Fall Unterschiede.

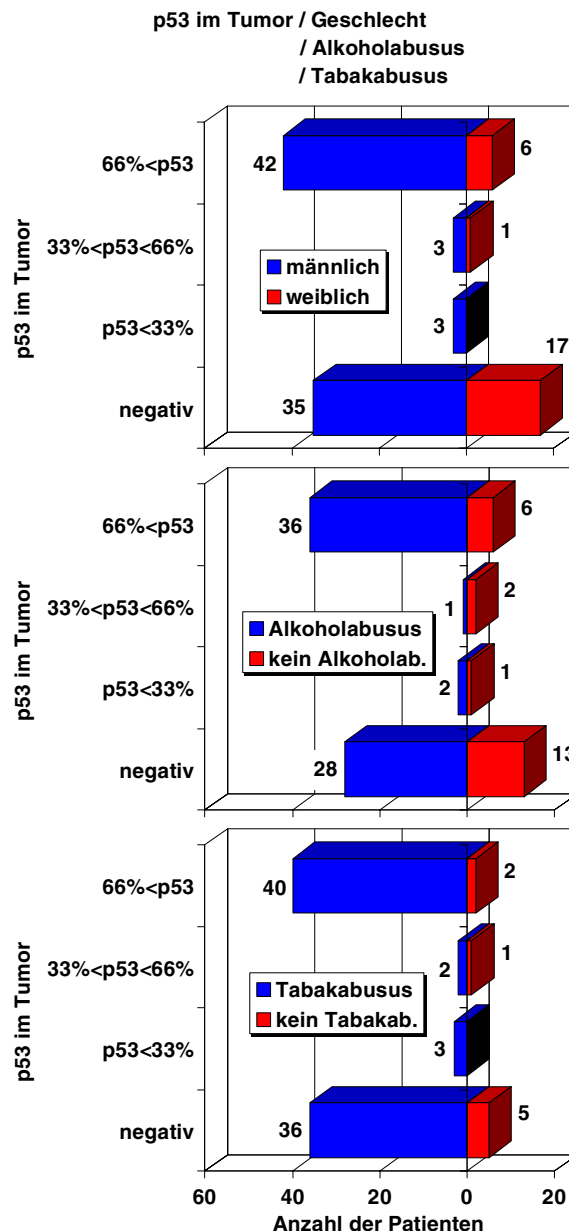


Abb. 29: Das p53 war bei männlichen Patienten signifikant häufiger im Tumorgewebe nachweisbar als bei weiblichen (Mann-Whitney U-Test: $p < 0,05$). Eine tendenziell erkennbare positive Korrelation zwischen dem Nachweis von p53 im Tumorgewebe und dem Alkohol- und Tabakabusus war dagegen statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test).

Die Ergebnisse des p53-Nachweises waren unabhängig von der Tumorlokalisation (Kruskal-Wallis-ANOVA) [139], dem Alter der Patienten, der Tumorgröße pT, der Lymphknotenmetastasierung pN, dem Tumorstadium und dem histopathologischen Grading G (Gamma-Test) [76]. Dagegen ergab sich eine Abhängigkeit vom Geschlecht der Patienten, wobei p53 bei männlichen Patienten signifikant häufiger im Tumorgewebe nachweisbar war als bei weiblichen (Abb. 29, Mann-Whitney U-Test: $p < 0,05$). Eine tendenziell erkennbare positive Korrelation zwischen dem Nachweis von p53 im Tumorgewebe und dem Alkohol- und Tabakabusus war dagegen statistisch nicht signifikant (Abb. 29, Mann-Whitney U-Test). Auch ein Einfluß des immunhistologischen Nachweises von p53 im Tumorgewebe auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier war nicht nachweisbar (Abb. 30).

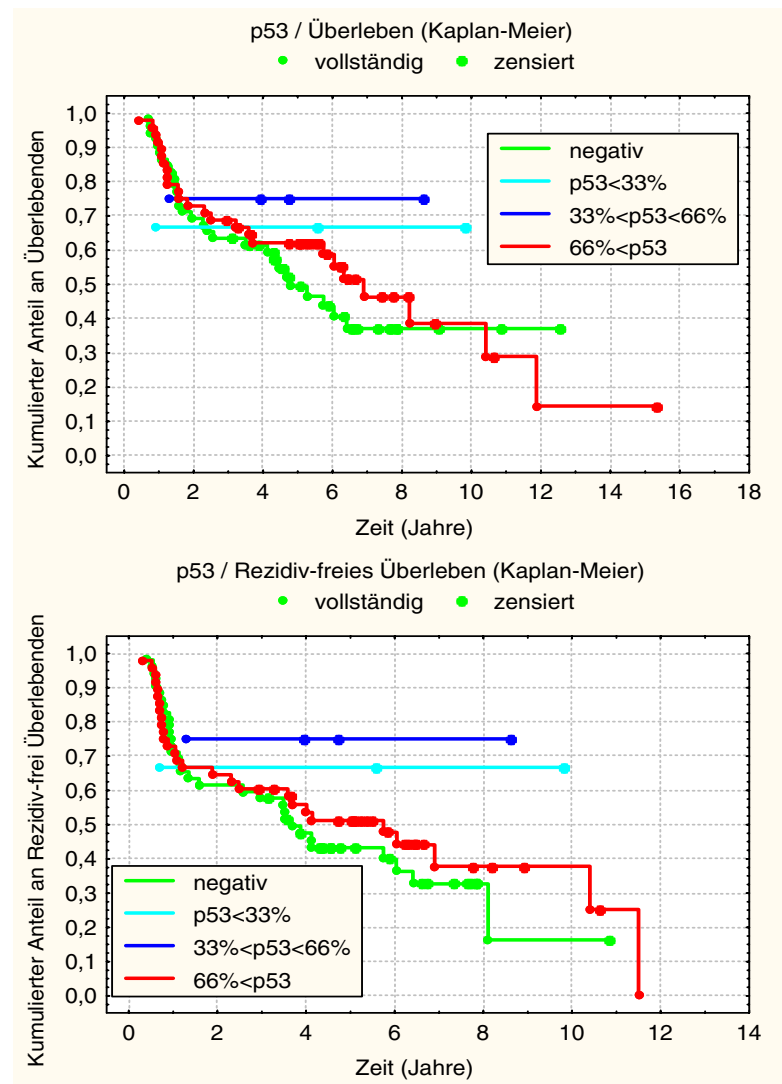


Abb. 30: Der immunhistologische Nachweis von p53 im Tumorgewebe zeigte weder einen signifikanten Einfluß auf das Überleben noch auf das Rezidiv-freie Überleben der Patienten (Kaplan-Meier).

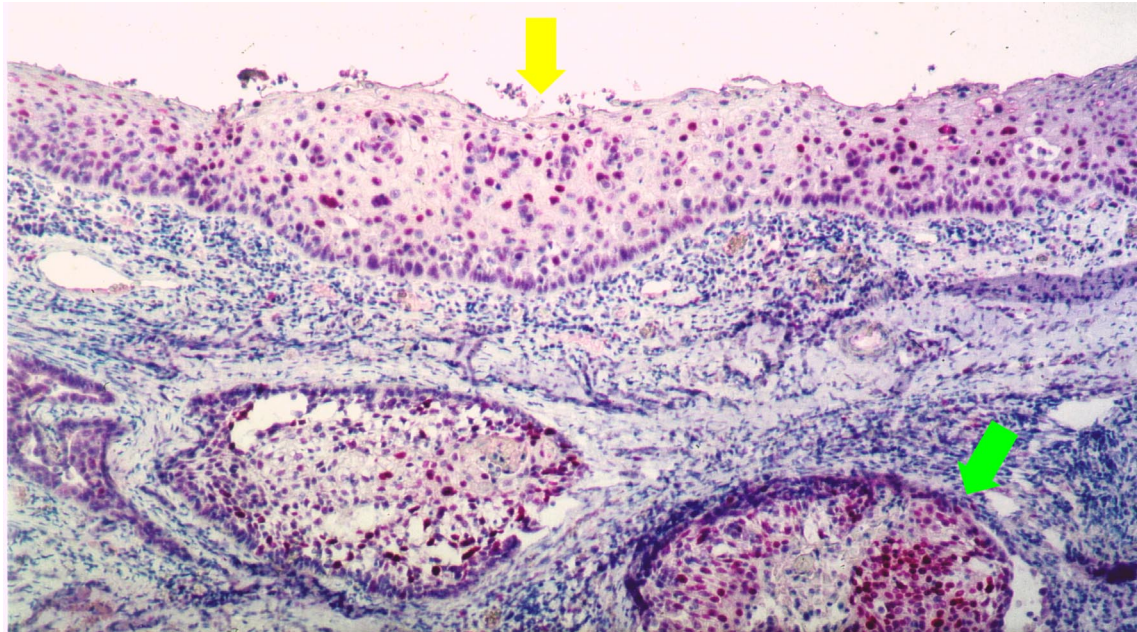
4.1.2 P90^{MDM2}

Abb. 31: Beim immunhistologischen Nachweis im hier gezeigten dysplastischen und auch im dysplasiefreien Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes war p90^{MDM2} bevorzugt in den höheren Zellagen wie dem Stratum spinosum und granulosum, aber nicht im Stratum basale zu finden (Gelber Pfeil). Wenn nur ein Teil der Zellkerne im Tumorgewebe positiv reagierte, waren es immer die der inneren, reiferen Zellen, während die äußeren, weniger ausdifferenzierten Zellagen negativ waren (Grüner Pfeil). Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: MDM2, Ab-1, OP46, Klon IF2 / Chromogen: Fast-Red / Gegenfärbung: Hämalaun); Originalvergrößerung: 100x.

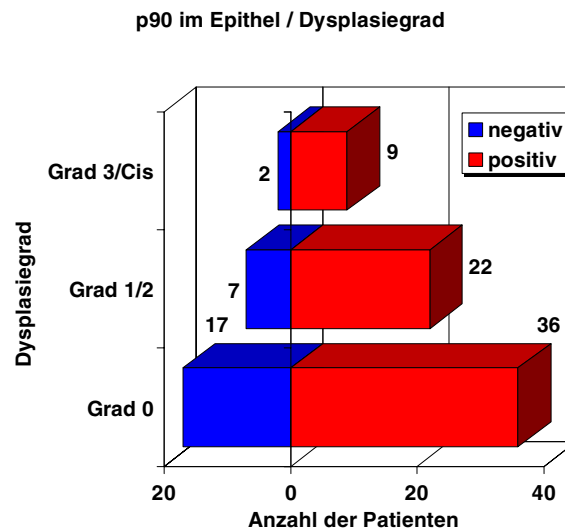


Abb. 32: Beim immunhistologischen Nachweis von p90^{MDM2} gab es im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes keinen signifikanten Zusammenhang zum Dysplasiegrad (Mann-Whitney U-Test).

Im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes blieb bei der immunhistologischen Färbung für p90^{MDM2} regelmäßig das Stratum basale ausgespart und wurden bevorzugt die Zellkerne im Stratum spinosum und granulosum angefärbt (Abb. 31). In den Fällen ohne Dysplasie war in 67,9%, bei einer geringen oder mäßigen Dysplasie in 75,9% und bei einer schweren Dysplasie oder einem Carcinoma in situ in 81,8% der Fälle p90^{MDM2} immunhistologisch im Epithel nachweisbar (Abb. 32). Es ergab sich damit zum Dysplasiegrad ebensowenig ein signifikanter Zusammenhang wie zum Alkohol- und Tabakabusus (Mann-Whitney U-Test). Aber sowohl im Epithel ohne Dysplasien (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,05$) als auch im dysplastischen

Epithel (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,02$) war eine positive Korrelation zwischen den immunhistologischen Nachweisen von p53 und p90^{MDM2} erkennbar (Tab. 3).

Tab. 3: Sowohl im dysplasiefreien Epithel (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,05$) und dysplastischen Epithel (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,02$) außerhalb der invasiv wachsenden Tumoren als auch im Tumorgewebe (Gamma-Test: $p < 0,001$) war eine signifikant positive Korrelation zwischen dem immunhistologischen Nachweis von p53 und p90^{MDM2} nachweisbar.

dysplasiefreies Epithel

p53	p90	negativ	positiv	Summe
negativ		15	22	37
positiv		2	14	16
Summe		17	36	53

dysplastisches Epithel

p53	p90	negativ	positiv	Summe
negativ		7	10	17
positiv		2	21	23
Summe		9	31	40

Tumorgewebe

p53	negativ	p90<33%	p90<66%	p90	Summe
negativ	20	20	6	6	52
p53<33%	0	1	1	1	3
33%<p53<66%	0	3	0	1	4
66%<p53	9	19	9	11	48
Summe	29	43	16	19	107

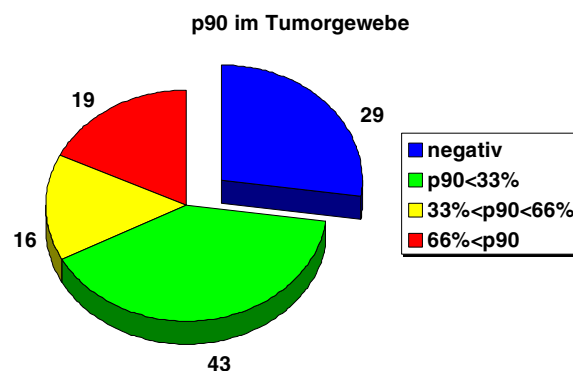


Abb. 33: Der immunhistologische Nachweis von p90^{MDM2} im Tumorgewebe war in 27,1% der Fälle komplett negativ und in 17,8% der Fälle in mindestens zwei Drittel der Tumorzellkerne positiv. Bei 55,1% der Tumoren gab es eine partielle Färbung der Tumorzellkerne.

Beim immunhistologischen Nachweis von p90^{MDM2} im Tumorgewebe resultierten nicht so scharfe Trennungen in positive und negative Fälle wie für p53 (Abb. 33). Bei Färbung von nur

einem Teil der Zellkerne war eine immunhistologische Anfärbung für p90^{MDM2} im Gegensatz zu p53 bevorzugt in den Zentren von umschriebenen Tumorealen erkennbar, wo die am weitesten ausdifferenzierten Zellen des Tumorgewebes lokalisiert sind. Die äußeren Zellagen waren dagegen regelmäßig negativ (Abb. 31). Bei den 31 Patienten, bei denen mehrere verschiedene Paraffinblöcke der Primärtumoren vorlagen, gab es Unterschiede in den immunhistologischen Färbungen für das p90^{MDM2} zwischen verschiedenen Gewebsschnitten von identischen Primärtumoren als Zeichen einer intratumoralen Heterogenität in 6 Fällen (19,4%). In den 9 Fällen, in denen die immunhistologische Färbung im Gewebe des Primärtumors mit der in den Lymphknotenmetastasen verglichen werden konnte, wurde je einmal der Primärtumor für das p90^{MDM2} als negativ und die zugehörige Lymphknotenmetastase mit einer positiven Reaktion in mehr als zwei Drittel der Tumorzellkerne sowie umgekehrt der Primärtumor mit einer positiven Reaktion in mindestens einem Drittel, aber weniger als zwei Drittel der Tumorzellkerne und die entsprechende Lymphknotenmetastase als negativ eingestuft. Ansonsten ergaben sich hier und auch in den beiden Fällen, in denen jeweils zwei verschiedene Lymphknotenmetastasen verglichen werden konnten, keine Unterschiede.

Tab. 4: Das p90^{MDM2} war in höher differenzierten Tumoren (G1) signifikant häufiger nachweisbar als in geringer differenzierten (G3, Gamma-Test: $p < 0,005$).

histopathologisches Grading				
p90	G1	G2	G3	Summe
negativ	1	21	7	29
p90<33%	4	30	9	43
33%<p90<66%	3	12	1	16
66%<p90	6	9	4	19
Summe	14	72	21	107

Die Ergebnisse des p90^{MDM2}-Nachweises waren unabhängig von der Tumorlokalisation (Kruskal-Wallis-ANOVA), dem Alkohol- und Tabakabusus, dem Geschlecht (Mann-Whitney U-Test) und Alter der Patienten, der Tumorgroße pT, der Lymphknotenmetastasierung pN und dem Tumorstadium (Gamma-Test). Es gab allerdings eine signifikante Korrelation zum histopathologischen Grading: P90^{MDM2} war in höher differenzierten Tumoren signifikant häufiger nachweisbar als in geringer differenzierten (Tab. 4, Gamma-Test: $p < 0,005$). Außerdem waren die immunhistologischen Nachweise von p53 und p90^{MDM2} im Tumorgewebe positiv miteinander korreliert (Tab. 3, Gamma-Test: $p < 0,001$). Der immunhistologische Nachweis von p90^{MDM2} im Tumorgewebe hatte keinen Einfluß auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier (Abb. 34).

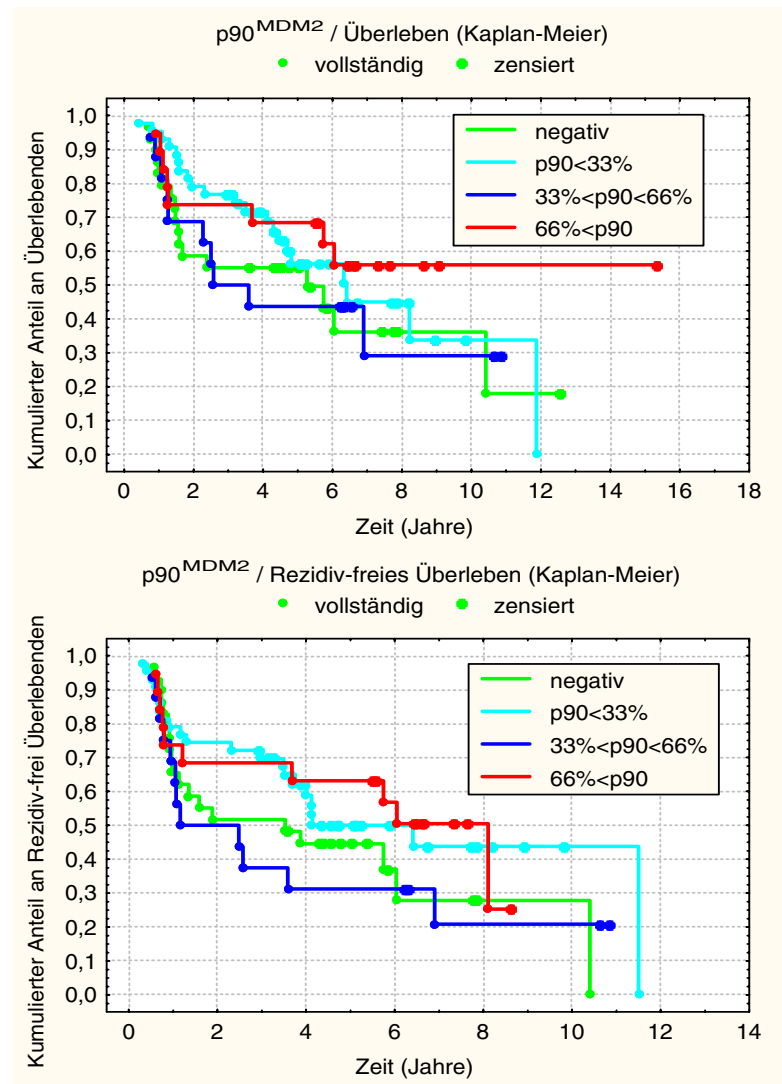


Abb. 34: Der immunhistologische Nachweis von p90^{MDM2} im Tumorgewebe zeigte weder einen signifikanten Einfluß auf das Überleben noch auf das Rezidiv-freie Überleben der Patienten (Kaplan-Meier).

4.1.3 P21^{CIP}

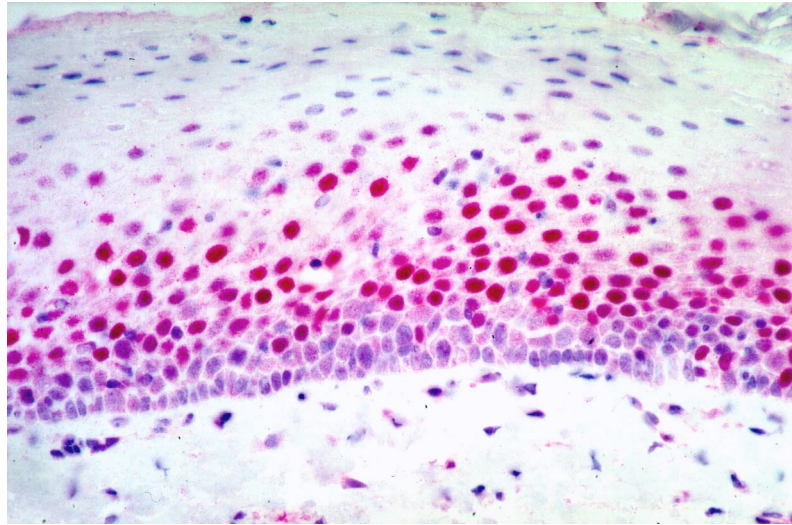


Abb. 35: Im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes war p21^{CIP} bevorzugt im Stratum spinosum und granulosum unter Aussparung des Stratum basale nachweisbar. Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: WAF1, Ab-1, OP64, Klon EA10 / Chromogen: Fast-Red / Gegenfärbung: Hämalaun); Originalvergrößerung: 200x.

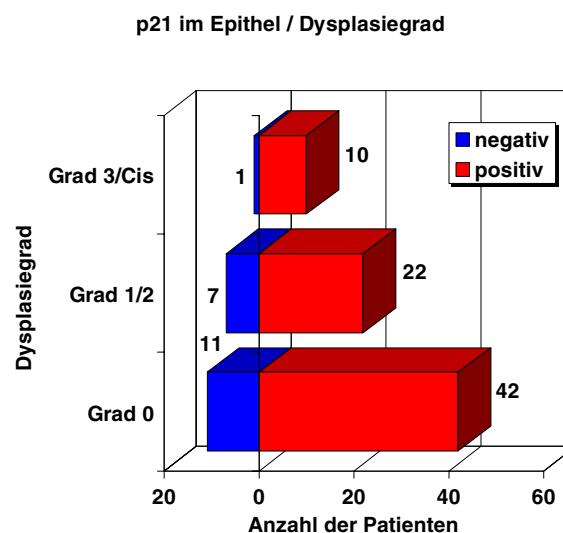


Abb. 36: Beim immunhistologischen Nachweis von p21^{CIP} im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes gab es keinen Zusammenhang mit dem Dysplasiegrad (Mann-Whitney U-Test).

Im Stratum basale des Epithels außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes war p21^{CIP} wie p90^{MDM2} regelmäßig nicht immunhistologisch nachweisbar. Dagegen wurden bevorzugt die Zellkerne im Stratum spinosum und granulosum angefärbt (Abb. 35), und zwar in 79,2% der Fälle, in denen keine Dysplasie im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumors erkennbar war, in 75,9% der Fälle mit einer geringen oder mäßigen Dysplasie und in 90,9% der Fälle mit einer schweren Dysplasie oder einem Carcinoma in situ (Abb. 36). Ein Zusammenhang zwischen dem p21^{CIP}-Nachweis im Epithel und dem Dysplasiegrad sowie dem Alkohol- und Tabakabusus der Patienten bestand nicht (Mann-Whitney U-Test). Eine positive Korrelation zur immunhistologischen Färbung für p53 war nur im dysplastischen Epithel (Mann-Whitney U-Test: $p < 0,05$), dagegen nicht im dysplasiefreien Epithel nachweisbar (Mann-Whitney U-Test, Tab. 5).

Tab. 5: Zwischen dem immunhistologischen Nachweis von p53 und p21^{CIP} ergab sich nur im dysplastischen Epithel (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,05$), nicht dagegen im dysplasiefreien Epithel (Chi-Quadrat-Test) und im Tumorgewebe (Gamma-Test) ein signifikant positiver Zusammenhang.

dysplasiefreies Epithel

p53	p21	negativ	positiv	Summe
negativ		9	28	37
positiv		2	14	16
Summe		11	42	53

dysplastisches Epithel

p53	p21	negativ	positiv	Summe
negativ		6	11	17
positiv		2	21	23
Summe		8	32	40

Tumorgewebe

p53	negativ	p21<33%	p21<66%	p21	Summe
negativ	6	17	15	14	52
p53<33%	0	0	2	1	3
33%<p53<66%	0	1	2	1	4
66%<p53	1	12	24	11	48
Summe	7	30	43	27	107

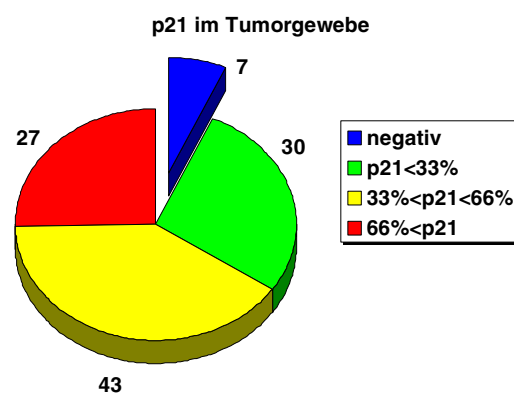


Abb. 37: Der immunhistologische Nachweis von p21^{CIP} im Tumorgewebe war in 6,5% der Fälle komplett negativ, in 68,2% partiell und in 25,2% in mehr als zwei Drittel der Zellkerne positiv.

Für p21^{CIP} ergaben sich ebenso wie für p90^{MDM2} nicht so scharfe Trennungen in positive und negative Fälle wie für p53 (Abb. 37). Bei nur partiell positiven Ergebnissen war eine immunhistologische Anfärbung der Zellkerne für p21^{CIP} ähnlich wie bei p90^{MDM2} bevorzugt im Inneren der Tumoreareale erkennbar, wo die am weitesten ausdifferenzierten Zellen des Tumorgewebes lokalisiert sind, wogegen die äußeren Zellagen regelmäßig negativ waren (Abb. 38). Bei den 31

Patienten, bei denen mehrere verschiedene Paraffinblöcke der Primärtumoren vorlagen, gab es Unterschiede in der immunhistologischen Färbung für p21^{CIP} zwischen den verschiedenen Gewebsschnitten des Primärtumors als Zeichen einer intratumoralen Heterogenität in 6 Fällen (19,4%). Bei den 9 Fällen, in denen die immunhistologische Färbung im Gewebe der Primärtumoren mit der in den Lymphknotenmetastasen verglichen werden konnte, wurde zweimal im Primärtumor p21^{CIP} in mindestens einem Drittel, aber weniger als zwei Drittel der Zellkerne gefunden, während die korrespondierenden Lymphknotenmetastasen negativ waren. Umgekehrt war einmal der Primärtumor negativ und die zugehörige Lymphknotenmetastase in mindestens einem Drittel, aber weniger als zwei Drittel der Zellkerne positiv und einmal der Primärtumor in weniger als einem Drittel und die entsprechende Lymphknotenmetastase in mindestens zwei Drittel der Zellkerne positiv. In den beiden Fällen, in denen jeweils zwei verschiedene Lymphknotenmetastasen untersucht werden konnten, ergaben sich keine Differenzen.

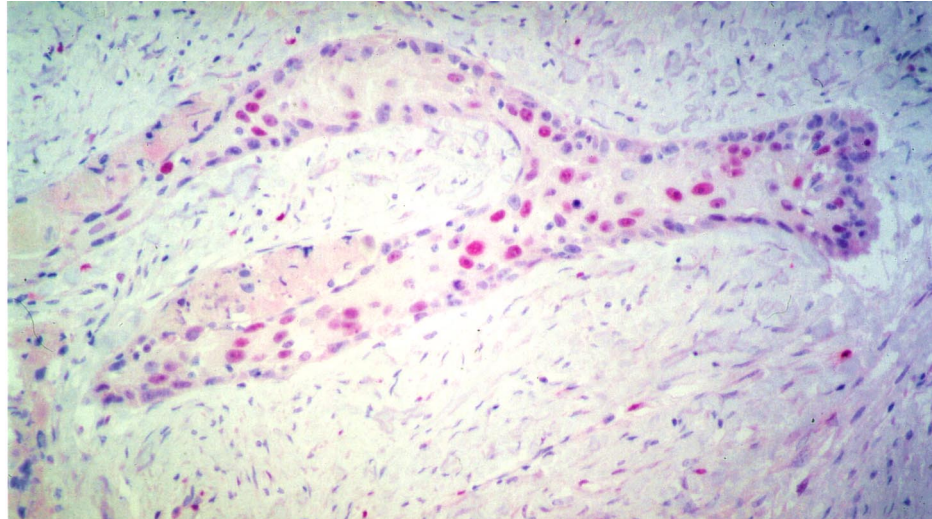


Abb. 38: Der immunhistologische Nachweis von p21^{CIP} war überwiegend in den im Zentrum von umschriebenen Tumorarealen gelegenen Zellkernen positiv, in den äußeren Zelllagen dagegen regelmäßig negativ. Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: WAF1, Ab-1, OP64, Klon EA10 / Chromogen: Fast-Red / Gegenfärbung: Hämalaun); Originalvergrößerung: 150x.

Die Ergebnisse des p21^{CIP}-Nachweises im Tumorgewebe waren unabhängig von der Tumorlokalisation (Kruskal-Wallis-ANOVA), dem Alkohol- und Tabakabusus, dem Geschlecht (Mann-Whitney U-Test) und Alter der Patienten, der Tumorgröße pT, der Lymphknotenmetastasierung pN, dem histopathologischen Grading, dem Tumorstadium, dem immunhistologischen Nachweis von p53 (Tab. 5, Gamma-Test) und dem Überleben und Rezidiv-freien Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier (Abb. 39).

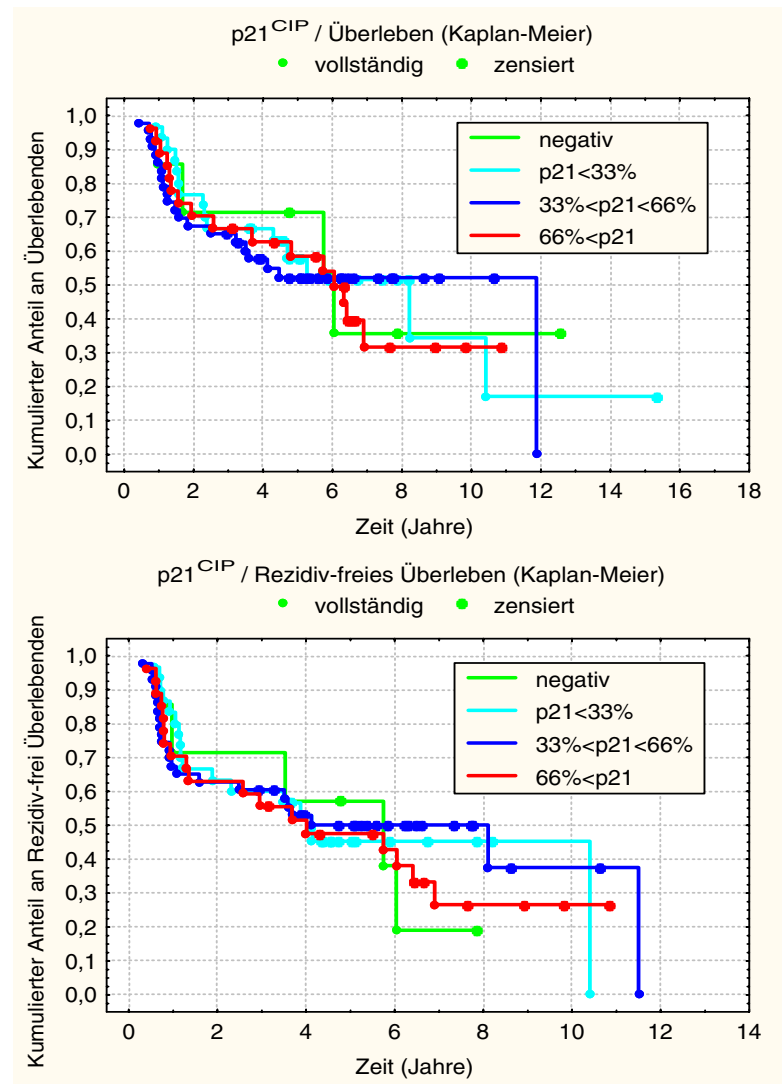


Abb. 39: Der immunhistologische Nachweis von p21^{CIP} im Tumorgewebe zeigte keinen Einfluß auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier.

4.1.4 P16^{INK4a}

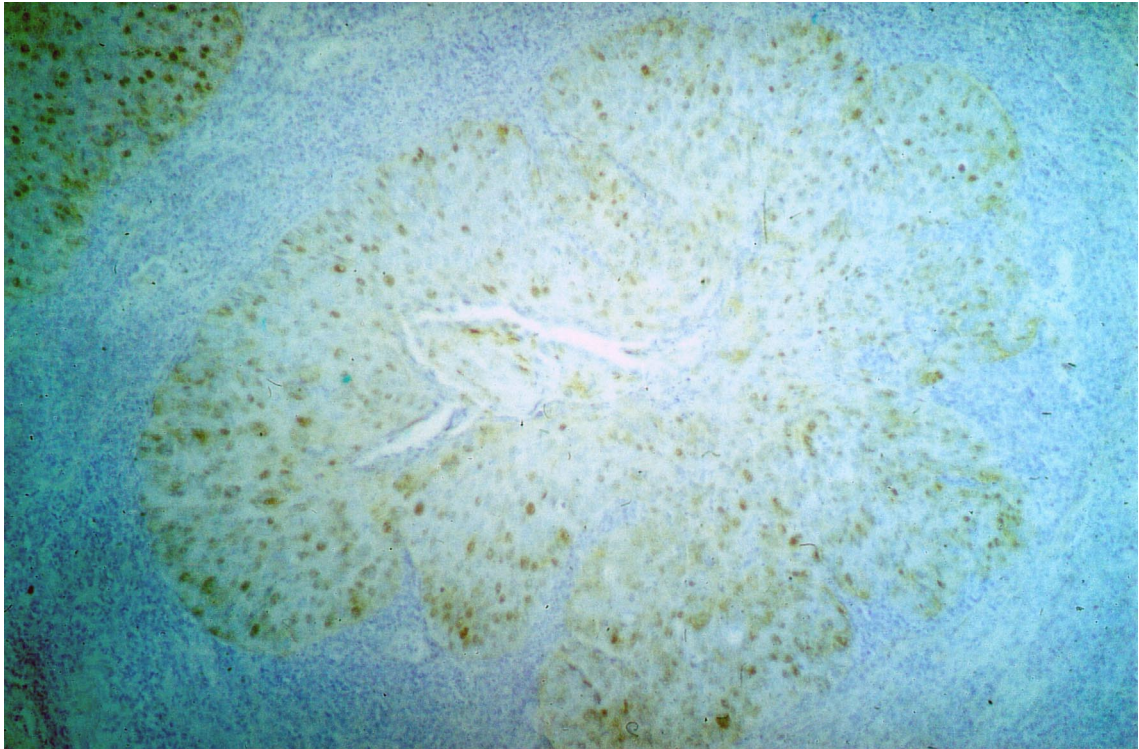


Abb. 40: Im Tumorgewebe ergab sich keine bevorzugte Lokalisation der p16^{INK4a}-positiven Zellen innerhalb umschriebener Gewebssareale. Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: 13521A, Klon G175-405 / Chromogen: Diaminobenzidin / Gegenfärbung: Hämalaun); Originalvergrößerung: 100x.

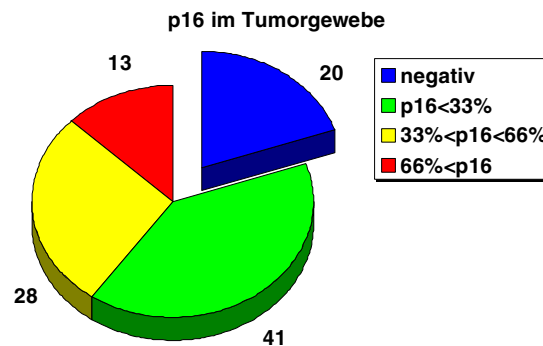


Abb. 41: Der immunhistologische Nachweis von p16^{INK4a} im Tumorgewebe war in 19,6% der Fälle komplett negativ, in 67,6% partiell und in 12,7% in mehr als zwei Drittel der Zellkerne positiv.

P16^{INK4a} war im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes ubiquitär unter Ausparung des Stratum basale als schwache nukleäre Braunfärbung immunhistologisch nachweisbar. Im Tumorgewebe waren die positiven Zellen gleichmäßig über die verschiedenen Gewebssareale verteilt (Abb. 40), wobei sich eine relativ regelmäßige Einordnung der Nachweisergebnisse in die verschiedenen Gruppen ergab (Abb. 41). Bei den 31 Patienten, bei denen mehrere verschiedene Paraffinblöcke der Primärtumoren vorlagen, resultierten Unterschiede in der immunhistologischen Färbung für p16^{INK4a} zwischen den verschiedenen Gewebsschnitten des Primärtumors als Zeichen einer intratumoralen Heterogenität nur in einem Fall (3,2%). Unterschiedliche Ergebnisse zwischen Primärtumoren und entsprechenden Lymphknotenmetastasen oder zwischen verschiedenen Lymphknotenmetastasen identischer Primärtumoren ergaben sich nicht.

Die Ergebnisse des p16^{INK4a}-Nachweises im Tumorgewebe waren unabhängig von der Tumorkomlokalisierung (Kruskal-Wallis-ANOVA), dem Alkohol- und Tabakabusus, dem Geschlecht (Mann-Whitney U-Test) und Alter der Patienten, der TumorgroöÖe pT, der Lymphknotenmetastasierung

pN, dem Tumorstadium, dem immunhistologischen Nachweis von p53, p90^{MDM2} und p21^{CIP} (Gamma-Test) sowie dem Überleben und Rezidiv-freien Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier (Abb. 42). P16^{INK4a} war zwar in höher differenzierten Tumoren tendenziell häufiger nachweisbar als in geringer differenzierten (Tab. 6), letztlich ergab sich aber auch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zum histopathologischen Tumor-Grading (Gamma-Test).

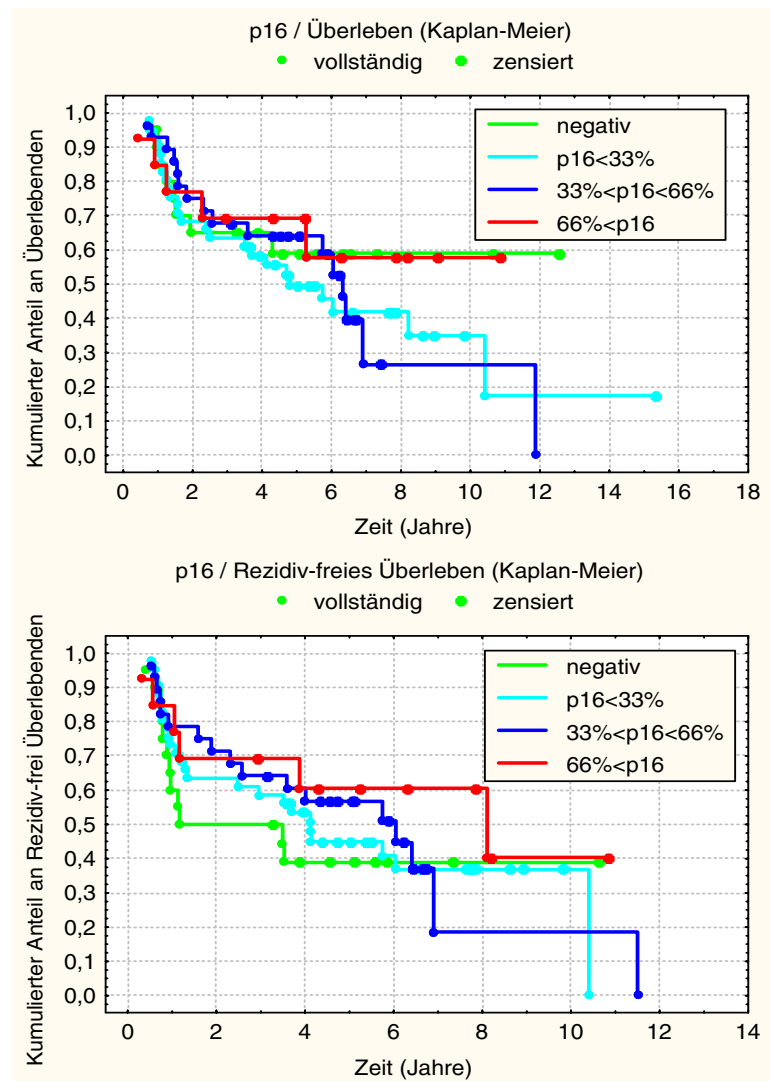


Abb. 42: Der immunhistologische Nachweis von p16^{INK4a} im Tumorgewebe zeigte keinen signifikanten Einfluß auf das Überleben oder Rezidiv-freie Überleben der Patienten (Kaplan-Meier).

Tab. 6: P16^{INK4a} war zwar in höher differenzierten Tumoren (G1) öfter nachweisbar als in geringer differenzierten (G3), dieser Zusammenhang war aber statistisch nicht signifikant (Gamma-Test).

histopathologisches Grading				
p16	G1	G2	G3	Summe
negativ	1	13	6	20
p16<33%	5	27	9	41
33%<p16<66%	5	21	2	28
66%<p16	2	7	4	13
Summe	13	68	21	102

4.1.5 Cyclin D1

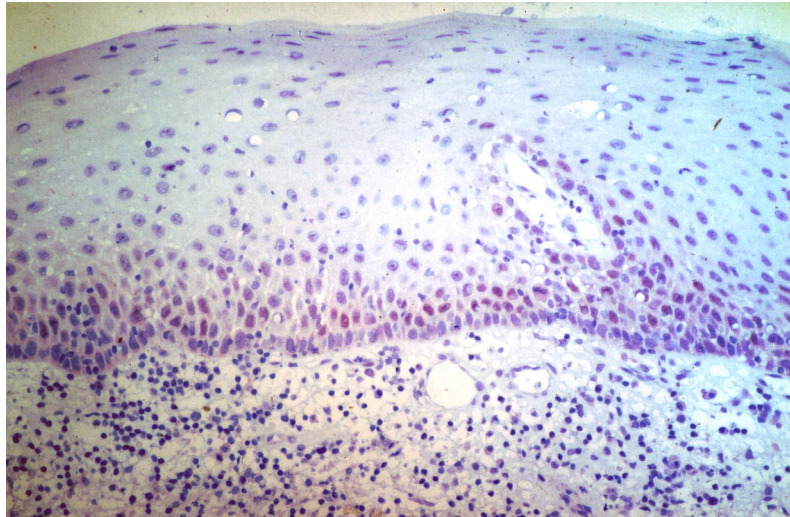


Abb. 43: Im Epithelbereich außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes war der immunhistologische Nachweis von Cyclin D1 regelmäßig auf die suprabasal gelegenen, bis ins Stratum spinosum reichenden Zellkerne beschränkt. Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: 18-0220, Klon Am29 / Chromogen: 3-Amino-9-äthylcarbazol / Gegenfärbung: Hämalun); Originalvergrößerung: 100x.

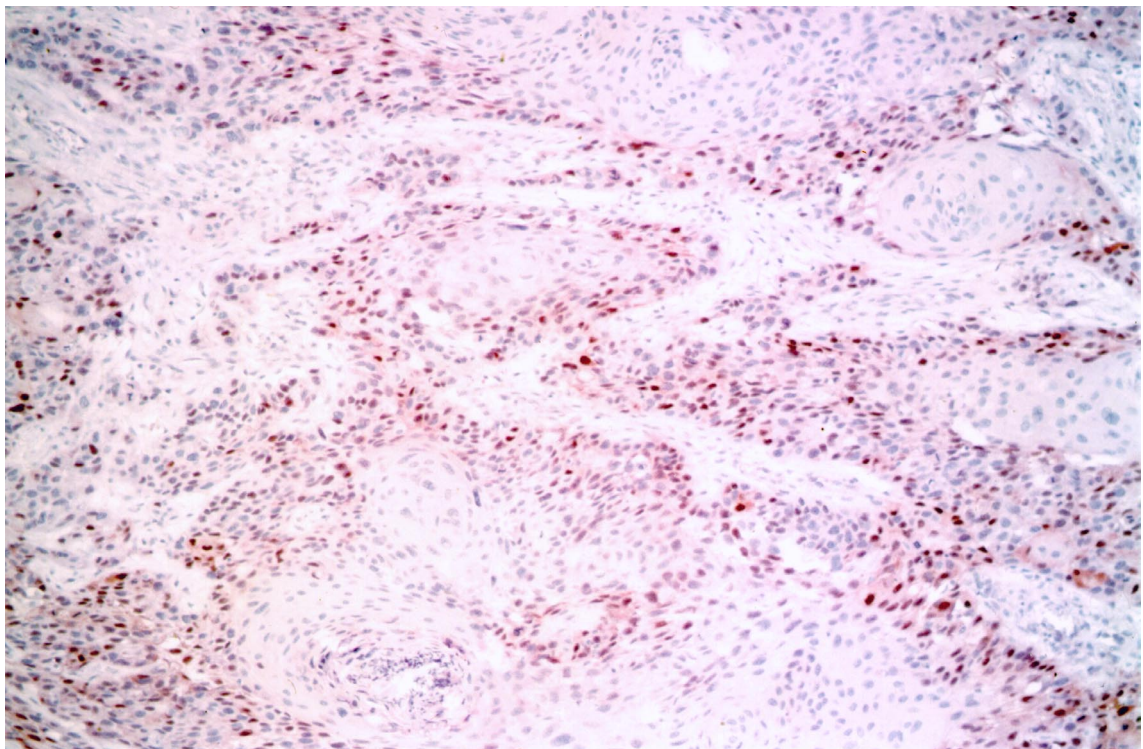


Abb. 44: Im Tumorbereich war Cyclin D1 bevorzugt in den äußeren Zellagen umschriebener Areale nachweisbar, während die zentral gelegenen Zellen bei nur partieller Färbung meistens keine Reaktion zeigten. Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: 18-0220, Klon Am29 / Chromogen: 3-Amino-9-äthylcarbazol / Gegenfärbung: Hämalun); Originalvergrößerung: 100x.

Im Epithelbereich außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes war der immunhistologische Nachweis von Cyclin D1 in den Zellkernen regelmäßig auf das Stratum spinosum beschränkt, während er in höheren Schichten und im Stratum basale negativ ausfiel (Abb. 43). Auch im Tumorbereich war Cyclin D1 in den meisten Fällen (93,6%) in unterschiedlichen Ausmaßen bevorzugt in den äußeren Zellagen von Tumorsträngen nachweisbar, während die zentral gelegenen Zellen meistens keine Reaktion zeigten (Abb. 44 und Abb. 45). Bei den 31 Patienten, bei denen mehrere verschiedene Paraffinblöcke der Primärtumoren vorlagen, gab es

Unterschiede in der immunhistologischen Färbung für Cyclin D1 zwischen den verschiedenen Gewebsschnitten des Primärtumors als Zeichen einer intratumoralen Heterogenität in 2 Fällen (6,5%). In den Fällen, in denen Primärtumoren und zugehörige Lymphknotenmetastasen oder jeweils zwei verschiedene Lymphknotenmetastasen miteinander verglichen werden konnten, ergaben sich keine Differenzen.

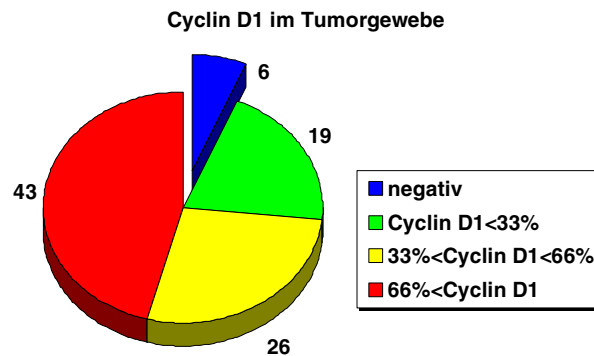


Abb. 45: Cyclin D1 war in den meisten Plattenepithelkarzinomen (93,6%) nachweisbar, in beinahe der Hälfte der Fälle (45,7%) sogar in mehr als zwei Drittel der Zellkerne.

Tab. 7: Zwischen dem Nachweis von Cyclin D1 und p21^{CIP} ergab sich im Tumorgewebe ein signifikant positiver Zusammenhang (Gamma-Test: $p < 0,001$).

Cyclin D1	p21				Summe
	negativ	p21<33%	p21<66%	p21	
negativ	2	3	1	0	6
Cyclin D1<33%	2	6	7	4	19
33%<Cyclin D1<66%	0	9	13	4	26
66%<Cyclin D1	1	11	15	16	43
Summe	5	29	36	24	94

Tab. 8: Cyclin D1 war in metastasierenden Tumoren (pN1 und pN2) häufiger nachweisbar als in nicht metastasierenden (pN0, Gamma-Test: $p < 0,001$).

Cyclin D1	Lymphknotenmetastasierung			Summe
	pN0	pN1	pN2	
negativ	6	0	0	6
Cyclin D1<33%	16	1	2	19
33%<Cyclin D1<66%	20	5	1	26
66%<Cyclin D1	25	5	13	43
Summe	67	11	16	94

Die Ergebnisse des Cyclin D1-Nachweises im Tumorgewebe waren unabhängig von der Tumoralokalisation (Kruskal-Wallis-ANOVA), dem Alkohol- und Tabakabusus, dem Geschlecht (Mann-Whitney U-Test) und Alter der Patienten, der Tumorgroße und -infiltration pT, dem histopathologischen Grading und dem immunhistologischen Nachweis von p53, p90^{MDM2} und p16^{INK4a} (Gamma-Test). Sie waren aber positiv korreliert mit dem Nachweis von p21^{CIP} im Tu-

morgewebe (Tab. 7, Gamma-Test: $p < 0,001$). Außerdem zeigte der Cyclin D1-Nachweis einen Zusammenhang mit der Lymphknotenmetastasierung: Cyclin D1 war in metastasierenden Tumoren häufiger nachweisbar als in nicht metastasierenden (Tab. 8, Gamma-Test: $p < 0,001$). Zwischen Primärtumoren und entsprechenden Lymphknotenmetastasen war allerdings, wie oben erwähnt, in keinem Fall ein Unterschied nachweisbar. Infolge der positiven Korrelation zwischen Cyclin D1-Nachweis und Lymphknotenmetastasierung pN ergab sich trotz fehlendem Zusammenhang mit der Tumorgroße und -infiltration pT eine solche Korrelation auch zur Tumorstadieneinteilung (Gamma-Test: $p < 0,02$). Eine prognostische Bedeutung für das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier hatte der immunhistologische Cyclin D1-Nachweis nicht (Abb. 46).

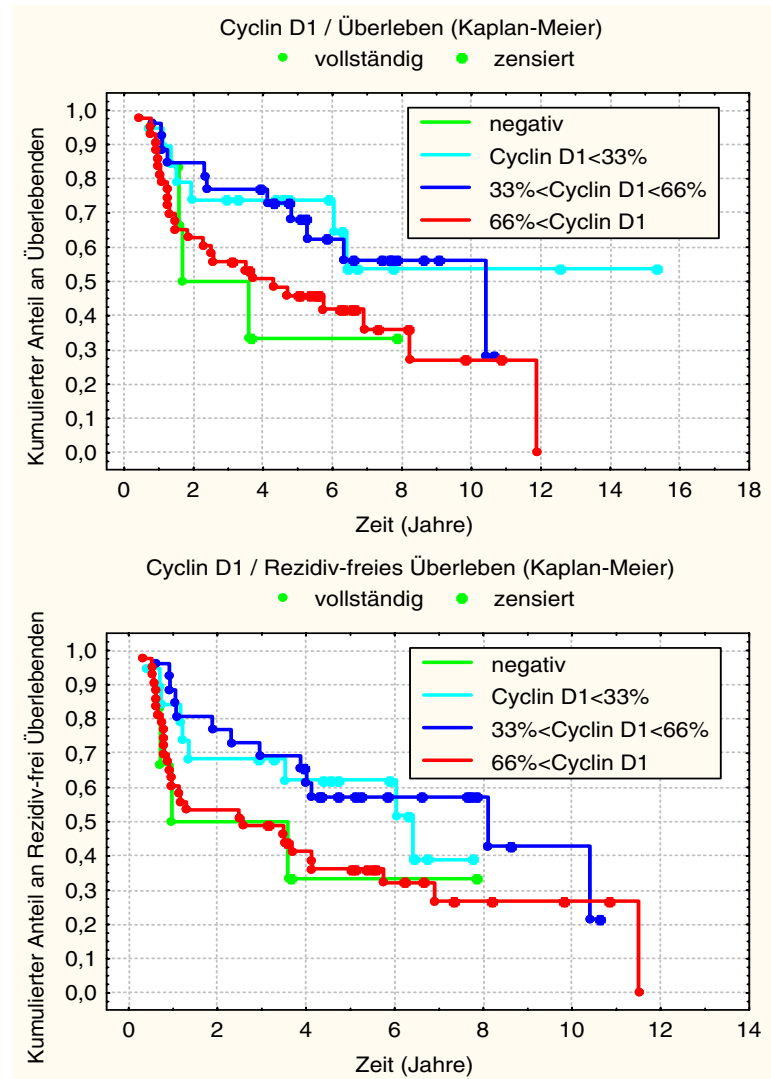


Abb. 46: Der immunhistologische Nachweis von Cyclin D1 im Tumorgewebe zeigte keinen signifikanten Einfluß auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier.

4.1.6 PRB

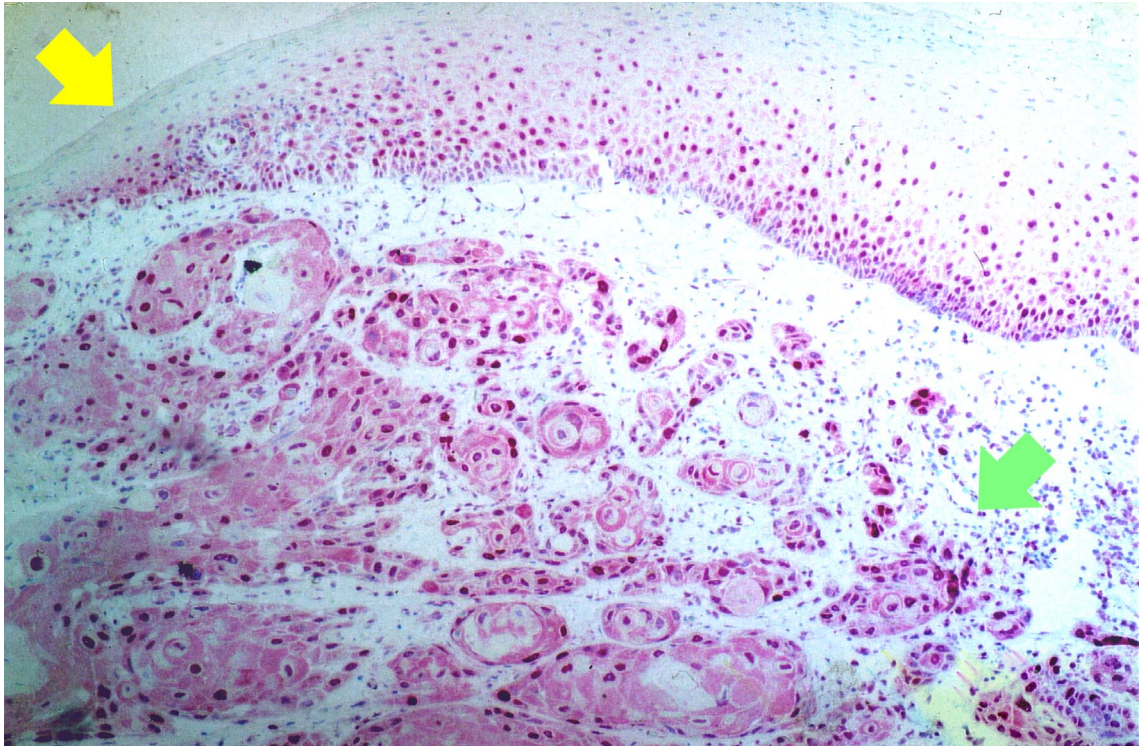


Abb. 47: Das durch das Retinoblastoma-Gen kodierte Phosphoprotein pRB war im gesamten Epithelgewebe mit Ausnahme der obersten Zellschichten immunhistologisch nachweisbar (Gelber Pfeil). Auch im Tumorgewebe war die nukleäre Färbung ohne Bevorzugung einer bestimmten Lokalisation innerhalb der Tumoreareale erkennbar (Grüner Pfeil). Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: MU2900396, Klon G3-245 / Chromogen: Fast-Red / Gegenfärbung: Hämalaun); Originalvergrößerung: 100x.

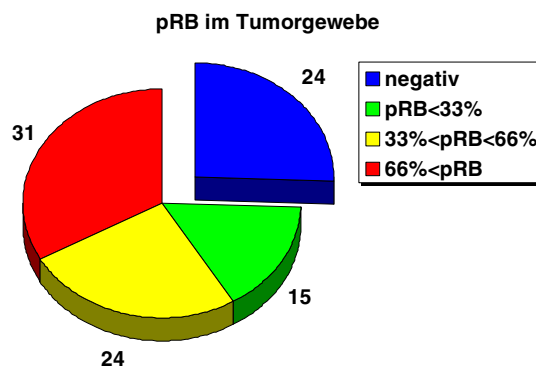


Abb. 48: PRB war im Tumorgewebe in unterschiedlichen Ausmaßen immunhistologisch nachweisbar.

Das durch das Retinoblastoma-Gen kodierte Phosphoprotein (pRB) war im gesamten Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes mit Ausnahme der obersten Zellschichten immunhistologisch nachweisbar (Abb. 47). In der überwiegenden Anzahl der Fälle (74,5%) war auch im Tumorbereich eine nukleäre Färbung ohne Bevorzugung einer bestimmten Lokalisation innerhalb der Tumoreareale beim immunhistologischen Nachweis von pRB erkennbar (Abb. 47 und Abb. 48). Bei den 31 Patienten, bei denen mehrere verschiedene Paraffinblöcke der Primärtumoren vorlagen, gab es Unterschiede in der immunhistologischen Färbung für pRB zwischen den verschiedenen Gewebsschnitten des Primärtumors als Zeichen einer intratumoralen Heterogenität in 8 Fällen (25,8%). Bei den 9 Fällen, in denen die immunhistologische Färbung im Gewebe der Primärtumoren mit der in den Lymphknotenmetastasen verglichen werden konnte, ergaben sich wie in den beiden Fällen, in denen jeweils zwei verschiedene Lymphknotenmetastasen untersucht werden konnten, keine Differenzen.

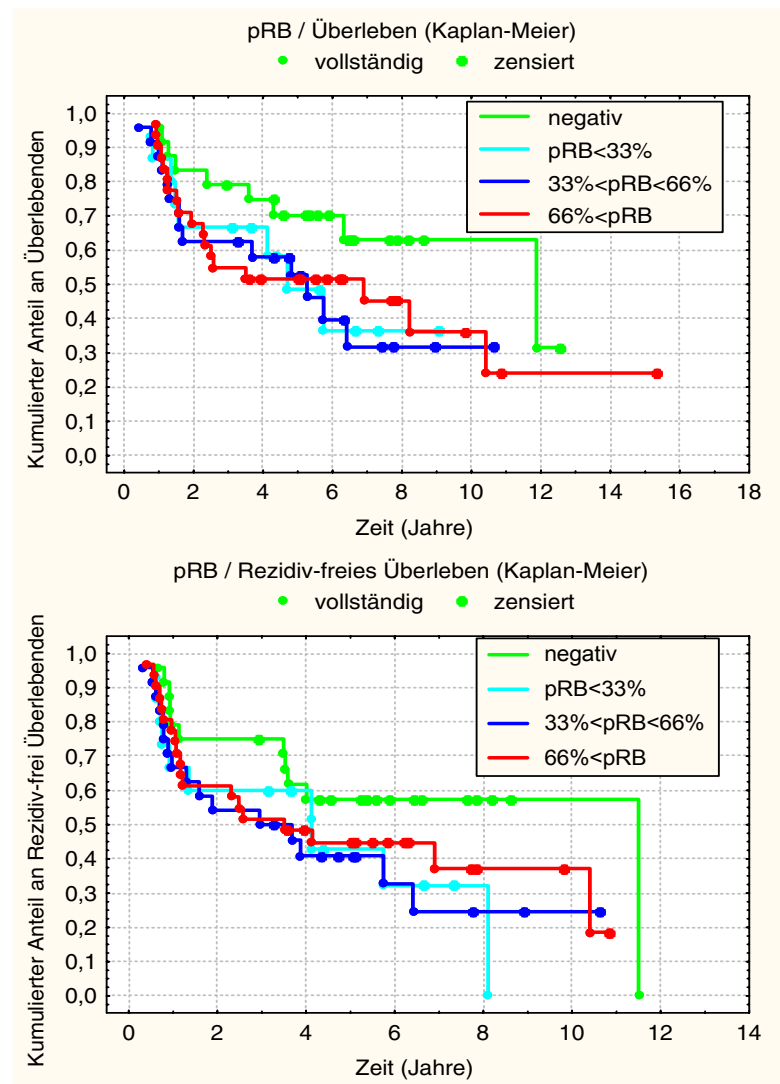


Abb. 49: Die Ergebnisse des pRB-Nachweises im Tumorgewebe zeigten keinen signifikanten Einfluß auf das Überleben und Rezidiv-freies Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier.

Tab. 9: Zwischen dem immunhistologischen Nachweis von pRB und P53 ergab sich im Tumorgewebe ein signifikant positiver Zusammenhang (Gamma-Test: $p < 0,05$).

pRB	p53				Summe
	negativ	p53<33%	33%<p53<66%	66%<p53	
negativ	13	1	1	9	24
pRB<33%	10	0	0	5	15
33%<pRB<66%	10	0	2	12	24
66%<pRB	12	1	1	17	31
Summe	45	2	4	43	94

Die Ergebnisse des pRB-Nachweises im Tumorgewebe waren unabhängig von der Tumorlokalisation (Kruskal-Wallis-ANOVA), dem Alkohol- und Tabakabusus, dem Geschlecht (Mann-Whitney U-Test) und Alter der Patienten, der Lymphknotenmetastasierung pN, dem histopathologischen Grading, dem immunhistologischen Nachweis von p90^{MDM2}, p21^{CIP}, p16^{INK4a} und Cyclin D1 (Gamma-Test) und dem Überleben und Rezidiv-freies Überleben der Patienten nach

Kaplan und Meier (Abb. 49). Es gab eine positive Korrelation zum immunhistologischen Nachweis von p53 (Tab. 9, Gamma-Test: $p < 0,05$). Außerdem war pRB in größeren Tumoren vermehrt nachweisbar (Tab. 10, Gamma-Test: $p < 0,002$), und damit bestand trotz fehlender Korrelation zur Lymphknotenmetastasierung auch ein positiver Zusammenhang mit dem Tumorstadium (Gamma-Test: $p < 0,01$).

Tab. 10: pRB war in größeren und die Nachbarstrukturen infiltrierenden Tumoren signifikant häufiger nachweisbar als in kleineren Tumoren ohne Infiltration von benachbarten Strukturen (Gamma-Test: $p < 0,002$).

Tumorgroße und -infiltration					
pRB	pT1	pT2	pT3	pT4	Summe
negativ	15	6	1	2	24
pRB<33%	10	4	0	1	15
33%<pRB<66%	15	6	0	3	24
66%<pRB	11	9	2	9	31
Summe	51	25	3	15	94

4.1.7 BCL-2

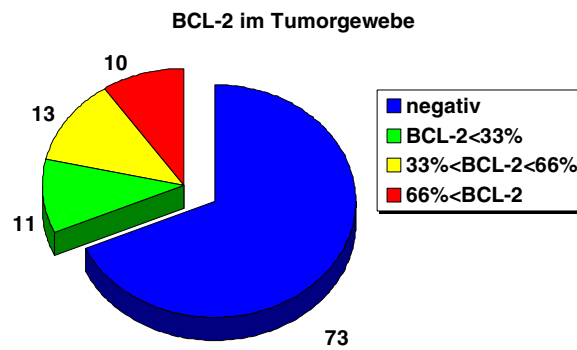


Abb. 50: BCL-2 konnte in nahezu einem Drittel der Fälle (31,8%) im Zytoplasma der Tumorzellen immunhistologisch nachgewiesen werden.

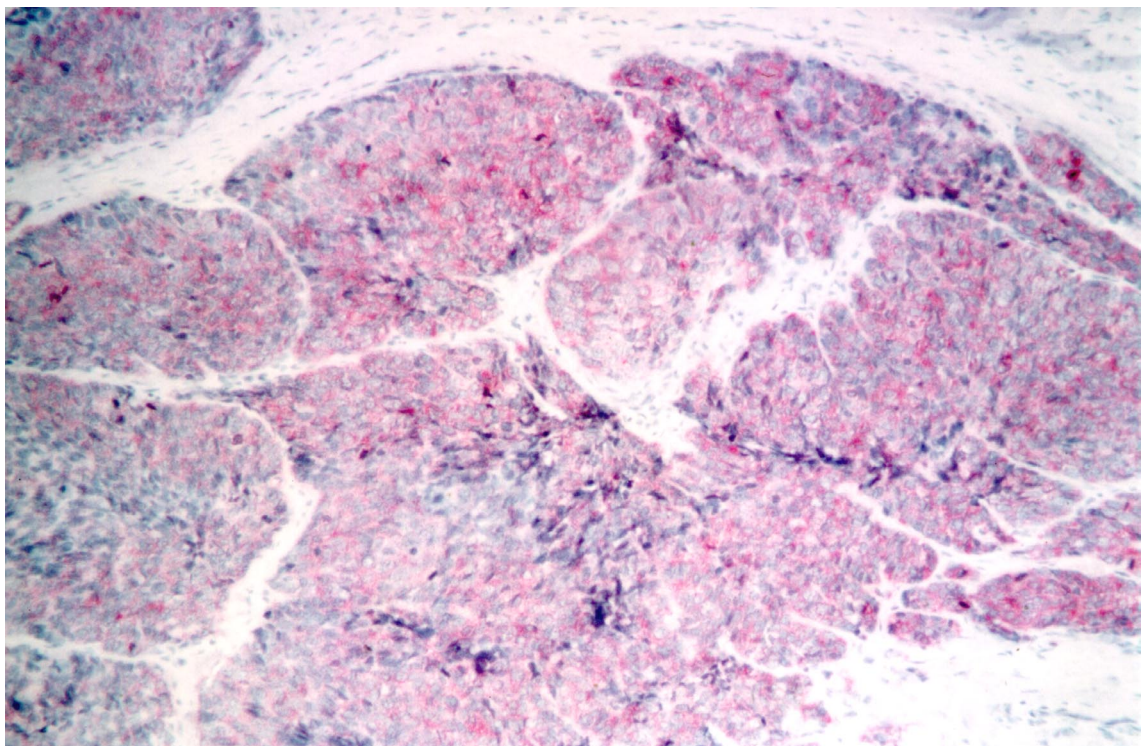


Abb. 51: Ein immunhistologischer Nachweis von BCL-2 war im Zytoplasma der Tumorzellen möglich. Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: M 887, Klon 124 / Chromogen: Fast-Red / Gegenfärbung: Hämalun); Originalvergrößerung: 150x.

BCL-2 konnte im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes nicht, im Zytoplasma der Tumorzellen aber in nahezu einem Drittel der Fälle (31,8%) in unterschiedlichen Intensitätsstufen nachgewiesen werden (Abb. 50). Das Färbungsmuster innerhalb umschriebener Tumorareale war bei nur teilweise positiver, hier allerdings im Zytoplasma lokalisierter immunhistologischer Färbung vergleichbar zu der Verteilung der p53-Expression, nämlich positiv in den äußeren und negativ in den inneren Zellagen der Tumoren (Abb. 51). In 3 von 31 Fällen (9,7%) war wiederum eine intratumorale Heterogenität mit Differenzen von mindestens zwei Eingruppierungen zwischen verschiedenen Gewebsschnitten identischer Primärtumoren nachweisbar. Verschiedene Färbungsintensitäten zwischen Primärtumoren und entsprechenden Lymphknotenmetastasen oder zwischen Lymphknotenmetastasen eines Primärtumors untereinander wurden nicht gefunden.

Die Ergebnisse des BCL-2-Nachweises im Tumorgewebe waren unabhängig von der Tumorlokalisation (Kruskal-Wallis-ANOVA), dem Alkohol- und Tabakabusus, dem Geschlecht (Mann-Whitney U-Test) und Alter der Patienten, der Tumorgroße pT, der Lymphknotenmetastasierung

pN, dem Tumorstadium, dem immunhistologischen Nachweis von p53, p90^{MDM2}, p21^{CIP}, p16^{INK4a}, Cyclin D1 und pRB (Gamma-Test) und dem Überleben und Rezidiv-freien Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier (Abb. 52). Es gab aber eine Korrelation zwischen dem Nachweis von BCL-2 und dem histopathologischen Grading: BCL-2 war in geringer differenzierten Tumoren vermehrt nachweisbar (Tab. 11, Gamma-Test: $p < 0,001$).

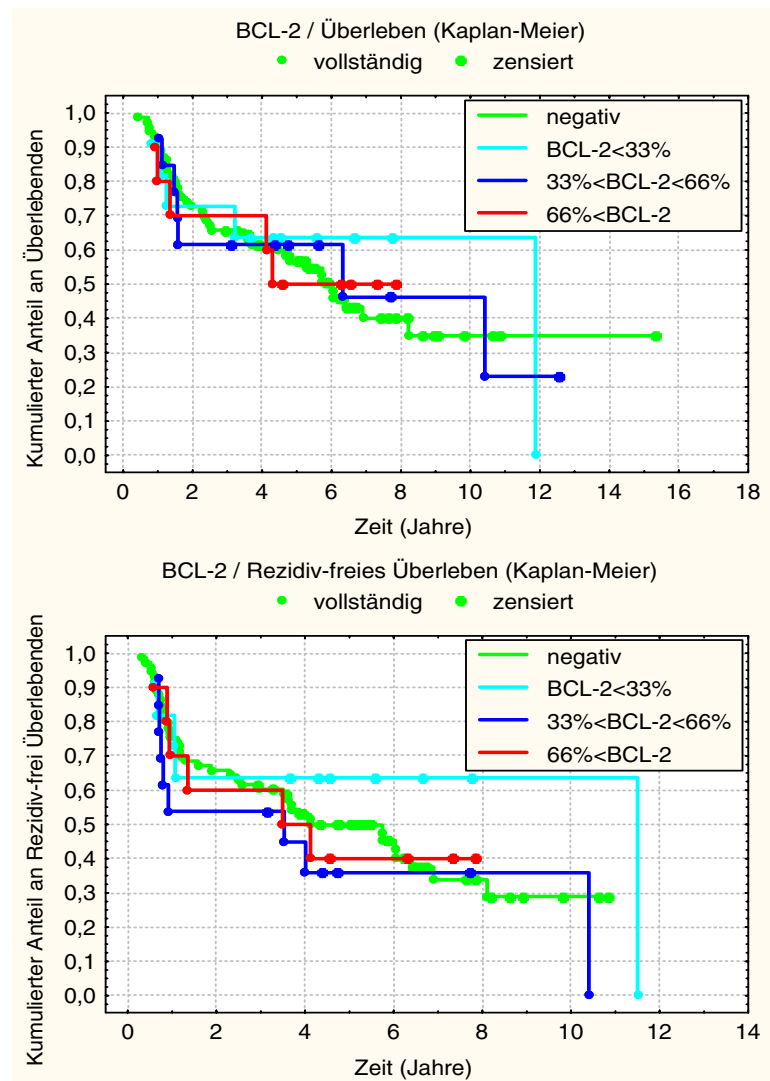


Abb. 52: Der immunhistologische Nachweis von BCL-2 im Tumorgewebe zeigte keinen Einfluß auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier.

Tab. 11: BCL-2 war in geringer differenzierten Tumoren gegenüber höher differenzierten Tumoren vermehrt nachweisbar (Gamma-Test: $p < 0,001$).

histopathologisches Grading				
BCL-2	G1	G2	G3	Summe
negativ	13	50	10	73
BCL-2 < 33%	1	9	1	11
33% < BCL-2 < 66%	0	8	5	13
66% < BCL-2	0	5	5	10
Summe	14	72	21	107

4.1.8 BAX

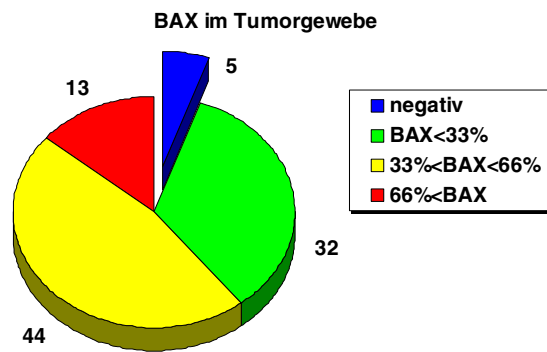


Abb. 53: BAX konnte in nahezu allen Fällen (94,7%) im Zytoplasma der Tumorzellen immunhistologisch nachgewiesen werden.

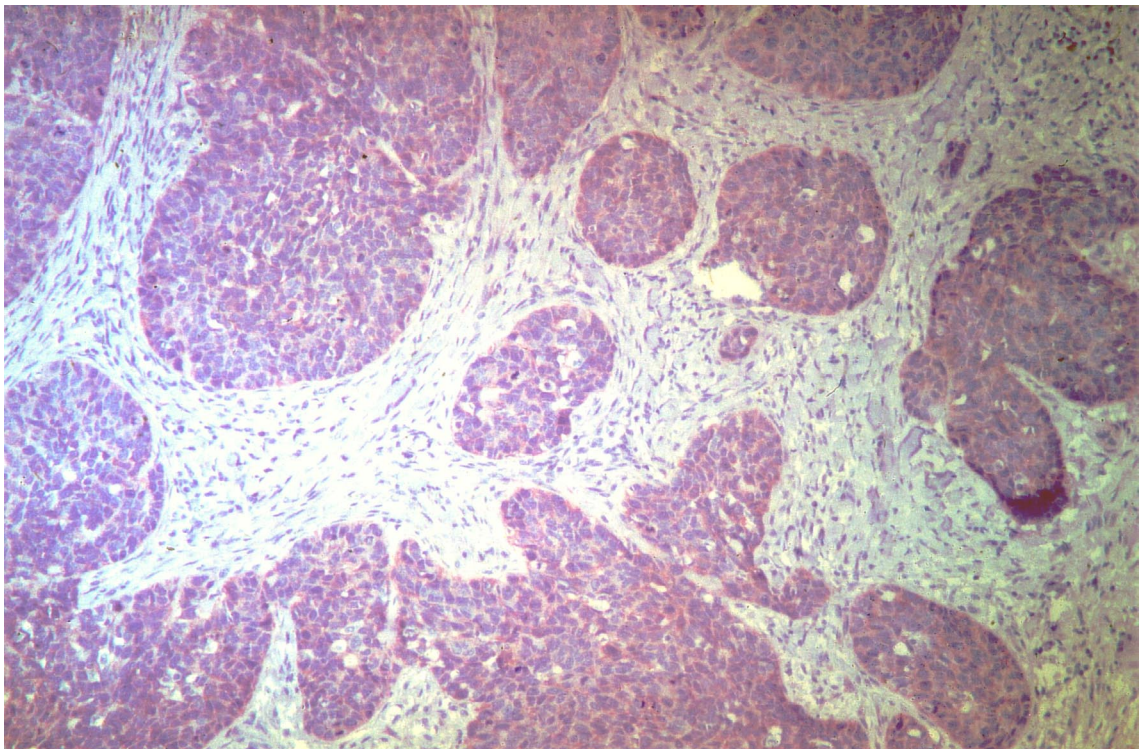


Abb. 54: Die zytoplasmatische Färbung beim immunhistologischen BAX-Nachweis war innerhalb der abgrenzbaren Tumorareale homogen verteilt. Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: 18-0218, Klon 2D2 / Chromogen: 3-Amino-9-äthylcarbazol / Gegenfärbung: Hämalaun); Originalvergrößerung: 100x.

BAX konnte im Zytoplasma der Tumorzellen in nahezu allen Fällen (94,7%) in unterschiedlichen Intensitätsstufen nachgewiesen werden (Abb. 53). Die Färbung war dabei innerhalb der verschiedenen Tumorareale relativ homogen verteilt (Abb. 54). In einem von 31 Fällen (3,2%) war wiederum eine intratumorale Heterogenität mit Differenzen von mindestens zwei Eingruppierungen zwischen verschiedenen Gewebsschnitten identischer Primärtumoren nachweisbar. Verschiedene Färbungsintensitäten zwischen Primärtumoren und entsprechenden Lymphknotenmetastasen oder zwischen Lymphknotenmetastasen eines Primärtumors untereinander wurden nicht gefunden.

Die Ergebnisse des BAX-Nachweises im Tumorgewebe waren unabhängig von der Tumorlokalisation (Kruskal-Wallis-ANOVA), dem Alkohol- und Tabakabusus, dem Geschlecht (Mann-Whitney U-Test) und Alter der Patienten, der Tumorgroße pT, der Lymphknotenmetastasierung pN, dem histopathologischen Grading, dem Tumorstadium und dem immunhistologischen Nachweis von p90^{MDM2}, p21^{CIP}, p16^{INK4a} und pRB (Gamma-Test). Es zeigte sich ein negativer

Einfluß der BAX-Expression auf die Dauer des Überlebens und Rezidiv-freies Überlebens der Patienten nach Kaplan und Meier, der statistisch aber nicht signifikant war (Abb. 55). Es ergab sich aber eine negative Korrelation zwischen dem immunhistologischen Nachweis von BAX und p53 im Tumorgewebe (Tab. 12, Gamma-Test: $p < 0,03$) und eine positive Korrelation zum Nachweis von Cyclin D1 (Tab. 13, Gamma-Test: $p < 0,05$). Außerdem waren die Ergebnisse des BAX-Nachweises reziprok zu denen des BCL-2-Nachweises (Tab. 14, Gamma-Test: $p < 0,001$).

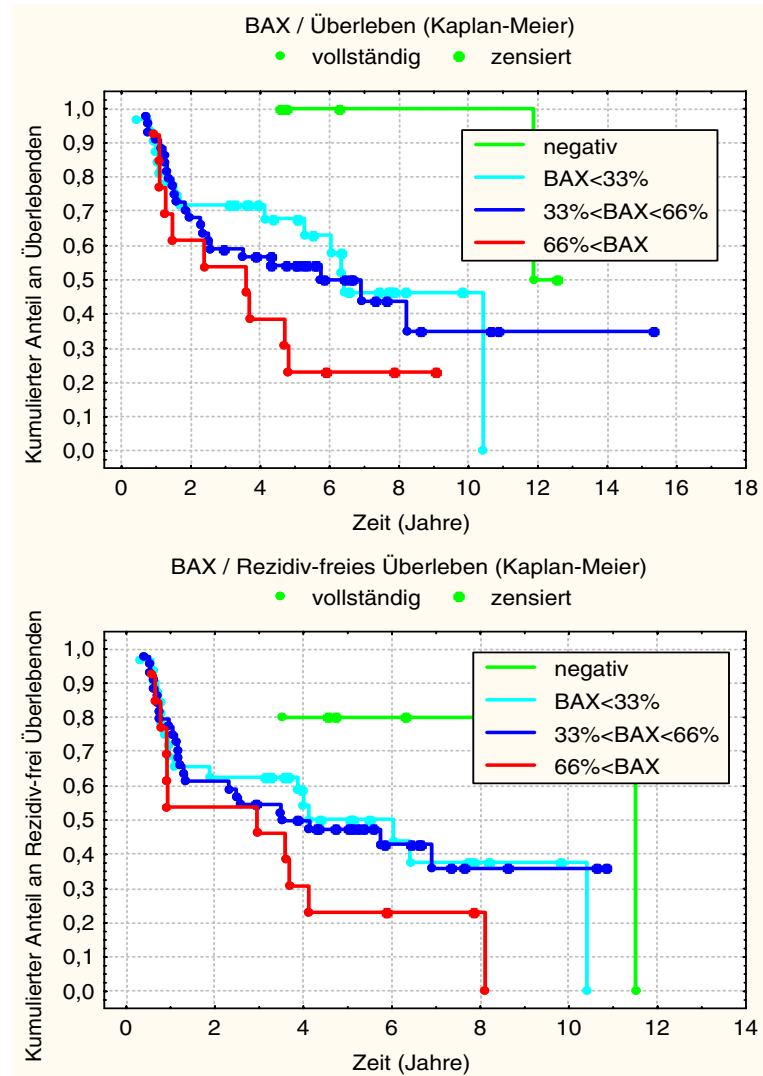


Abb. 55: Der immunhistologische Nachweis von BAX im Tumorgewebe zeigte einen negativen Einfluß auf die Dauer des Überlebens und Rezidiv-freies Überlebens der Patienten nach Kaplan und Meier, der aber statistisch nicht signifikant war.

Tab. 12: Zwischen dem immunhistologischen Nachweis von BAX und p53 im Tumorgewebe ergab sich eine signifikant negative Korrelation (Gamma-Test: $p < 0,03$).

BAX	negativ	p53			Summe
		p53<33%	p53<66%	p53	
negativ	2	0	0	3	5
BAX<33%	13	1	1	17	32
33%<BAX<66%	22	1	3	18	44
66%<BAX	9	0	0	4	13
Summe	46	2	4	42	94

Tab. 13: Zwischen dem immunhistologischen Nachweis von BAX und Cyclin D1 war im Tumorgewebe ein signifikant positiver Zusammenhang nachweisbar (Gamma-Test: $p < 0,05$).

BAX	negativ	Cyclin D1			Summe
		Cyclin D1<33%	Cyclin D1<66%	Cyclin D1	
negativ	0	4	0	1	5
BAX<33%	4	5	9	13	31
33%<BAX<66%	1	8	12	22	43
66%<BAX	1	1	5	6	13
Summe	6	18	26	42	92

Tab. 14: Die immunhistologischen Nachweisergebnisse von BAX und BCL-2 im Tumorgewebe waren negativ miteinander korreliert (Gamma-Test: $p < 0,001$).

BAX	negativ	BCL-2			Summe
		BCL-2<33%	BCL-2<66%	BCL-2	
negativ	0	1	2	2	5
BAX<33%	17	4	7	4	32
33%<BAX<66%	34	4	3	3	44
66%<BAX	11	0	1	1	13
Summe	62	9	13	10	94

4.1.9 E-Cadherin

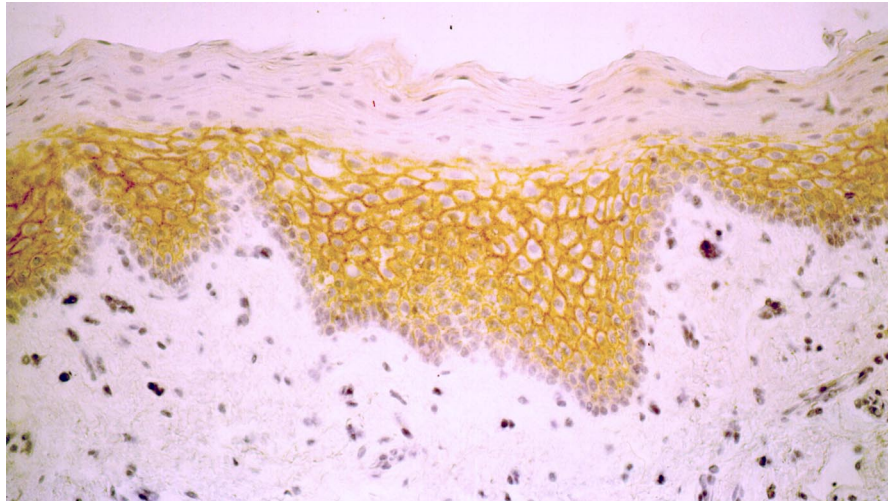


Abb. 56: Beim immunhistologischen Nachweis von E-Cadherin ergab sich im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes ausnahmslos eine membranöse Färbung der Zellen im Stratum spinosum und granulosum unter Aussparung des Stratum basale. Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: PC10028, Klon 5H9 / Chromogen: Diaminobenzidin / Gegenfärbung: Hämaun); Originalvergrößerung: 150x.

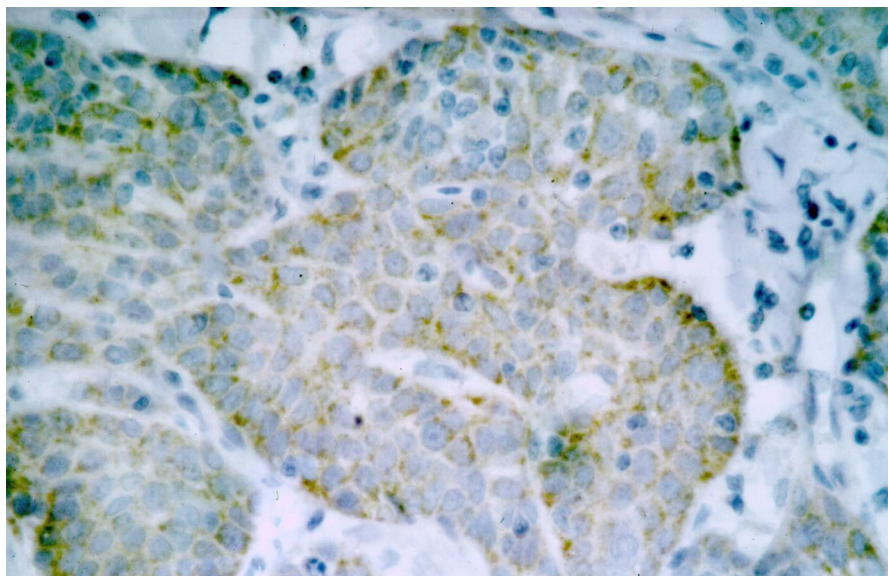


Abb. 57: Im Tumorgewebe konnte E-Cadherin in der Mehrzahl der Fälle ebenfalls immunhistologisch nachgewiesen werden. Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: PC10028, Klon 5H9 / Chromogen: Diaminobenzidin / Gegenfärbung: Hämaun); Originalvergrößerung: 200x.

Beim immunhistologischen Nachweis von E-Cadherin ergab sich im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes in allen Fällen, in denen solches Epithel auf den Gewebsschnitten miterfaßt war, eine membranöse Färbung im Stratum spinosum und granulosum unter Aussparung des Stratum basale (Abb. 56). Im Tumorgewebe konnte E-Cadherin in der Mehrzahl dieser Fälle (84,6%) ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 57). Die Färbung war aber nur in etwa der Hälfte der Fälle (49,5%) vergleichbar zum Epithel auf die Zellmembran begrenzt. In 20,9% der Fälle ergab sich auch im Zytoplasma der Tumorzellen eine vergleichbare positive Reaktion und in 14,3% der Fälle war diese sogar überwiegend oder ausschließlich auf das Zytoplasma beschränkt (Abb. 58). In 2 von 31 Fällen (6,5%) bestand eine intratumorale Heterogenität, wobei in beiden Fällen eine überwiegend zytoplasmatische Färbung einer überwiegend membranösen Färbung in verschiedenen Gewebsschnitten identischer Primärtumoren gegenüberstand. In einem von 9 Fällen (11,1%), in denen ein Vergleich zwischen Primärtumoren und zugehörigen Lymphknotenmetastasen möglich war, resultierte eine zytoplasmatische Färbung

der Zellen im Primärtumor, während die zugehörige Lymphknotenmetastase negativ war. Zwischen verschiedenen Lymphknotenmetastasen ein und desselben Primärtumors gab es in keinem Fall Unterschiede.

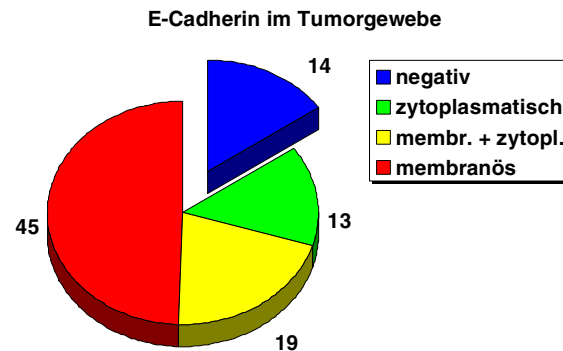


Abb. 58: Die Färbung beim immunhistologischen Nachweis von E-Cadherin war nur in etwa der Hälfte der Fälle (49,5%) auf die Zellmembranen beschränkt. In 20,9% der Fälle ergab sich im Zytoplasma eine vergleichbare Färbung und in 14,3% der Fälle war diese sogar überwiegend im Zytoplasma zu finden. Die übrigen 15,4% waren komplett negativ.

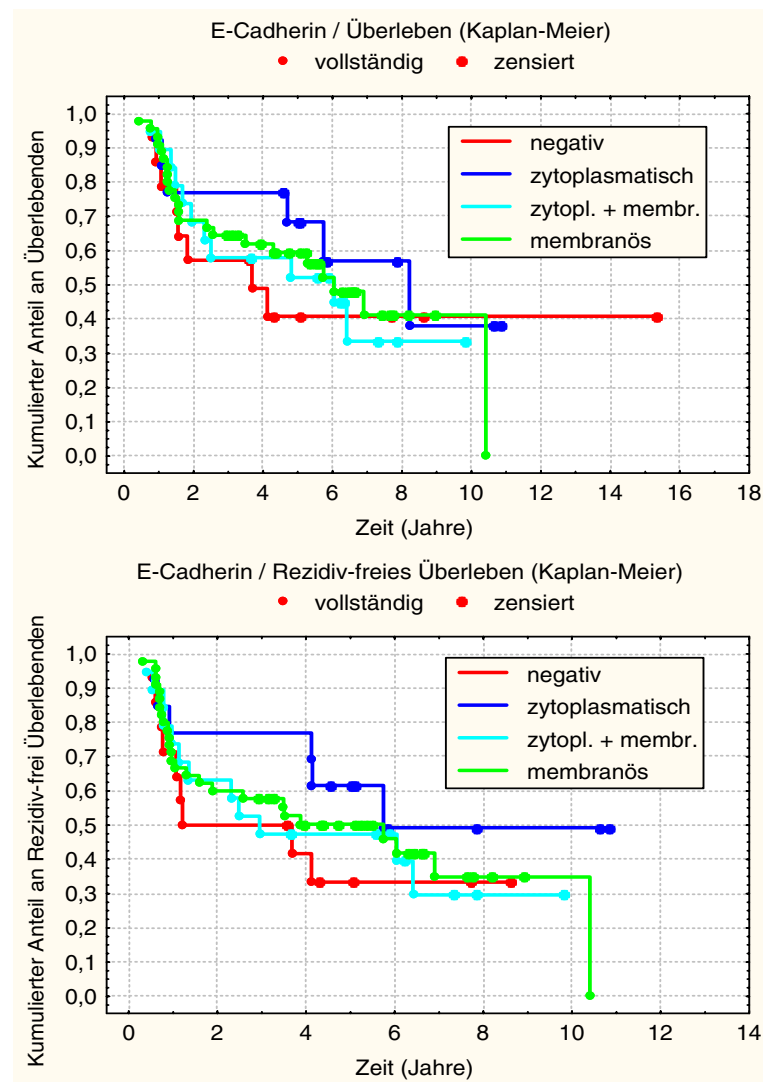


Abb. 59: Zwischen dem Färbungsmuster des immunhistologischen E-Cadherin-Nachweises im Tumorgewebe und dem Überleben und Rezidiv-freies Überleben nach Kaplan und Meier ergab sich kein signifikanter Zusammenhang.

Die Ergebnisse des E-Cadherin-Nachweises im Tumorgewebe waren unabhängig vom Alkohol- und Tabakabusus, dem Geschlecht (Mann-Whitney U-Test) und Alter der Patienten, der Tumorlokalisation, der Tumorgroße pT, der Lymphknotenmetastasierung pN, dem histopathologischen Grading, dem Tumorstadium, den hier vorher aufgeführten, immunhistologisch bestimmten Parametern (Kruskal-Wallis-ANOVA) und dem Überleben und Rezidiv-freien Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier (Abb. 59). Bei einem Vergleich des Überlebens und Rezidiv-freien Überlebens zwischen den negativen und den unabhängig vom Färbungsmuster positiven Fällen zeigte sich tendenziell ein Nachteil der Patienten mit einem fehlenden E-Cadherin-Nachweis im Tumorgewebe, der aber statistisch nicht signifikant war (Abb. 60).

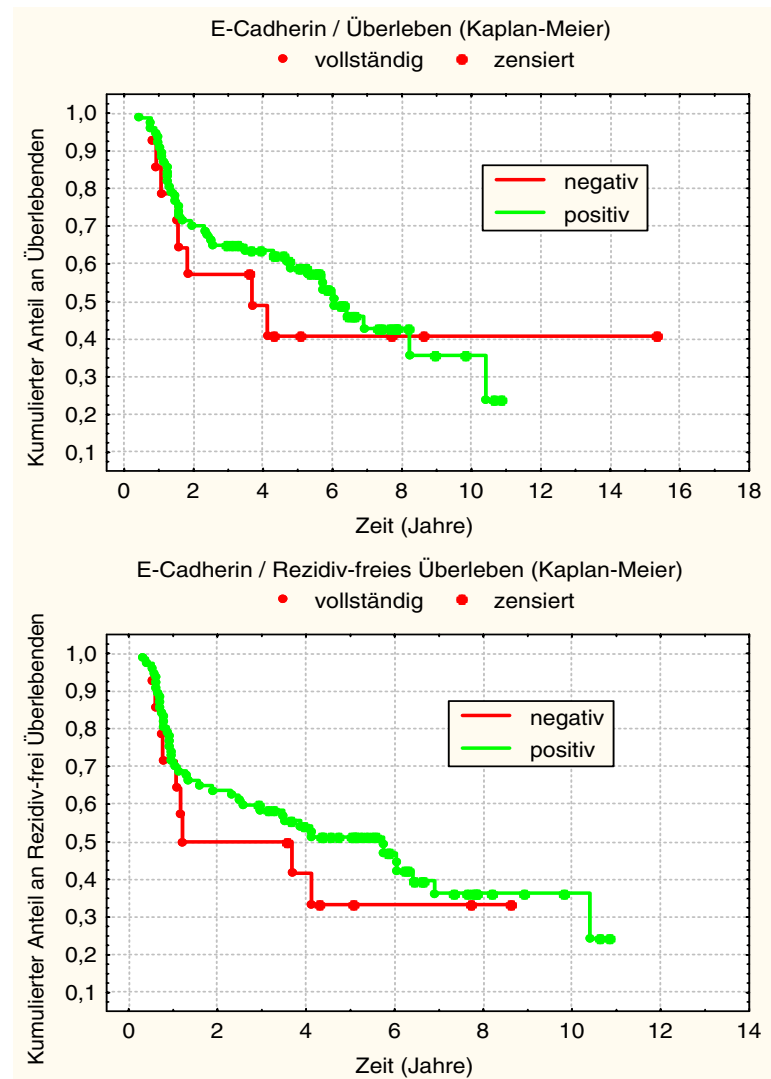


Abb. 60: Beim Vergleich des Überlebens und Rezidiv-freien Überlebens zwischen den beim immunhistologischen E-Cadherin-Nachweis im Tumorgewebe negativen und unabhängig vom Färbungsmuster positiven Fällen zeigte sich tendenziell ein Nachteil für die Patienten mit fehlendem E-Cadherin-Nachweis, der aber statistisch nicht signifikant war.

4.1.10 CD44

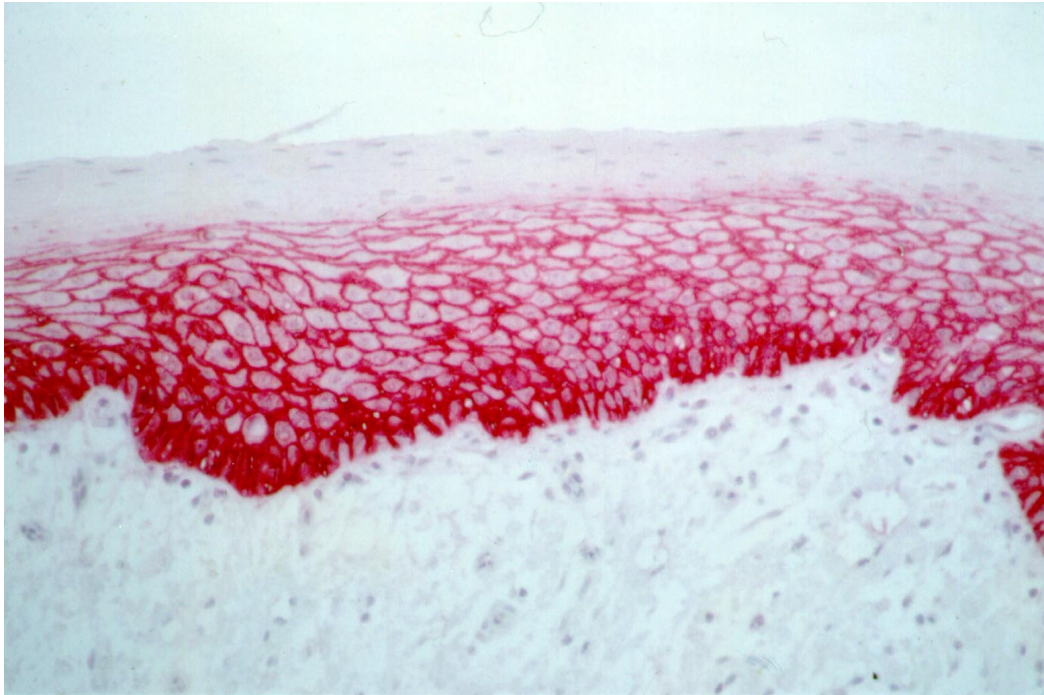


Abb. 61: Der immunhistologische Nachweis der verschiedenen CD44-Isoformen (hier CD44v4) führte im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes ausnahmslos zu einer membranösen Färbung im Stratum basale, spinosum und granulosum. Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: BMS114, Klon VFF-11 / Chromogen: Fast-Red / Gegenfärbung: Hämalaun); Originalvergrößerung: 200x.

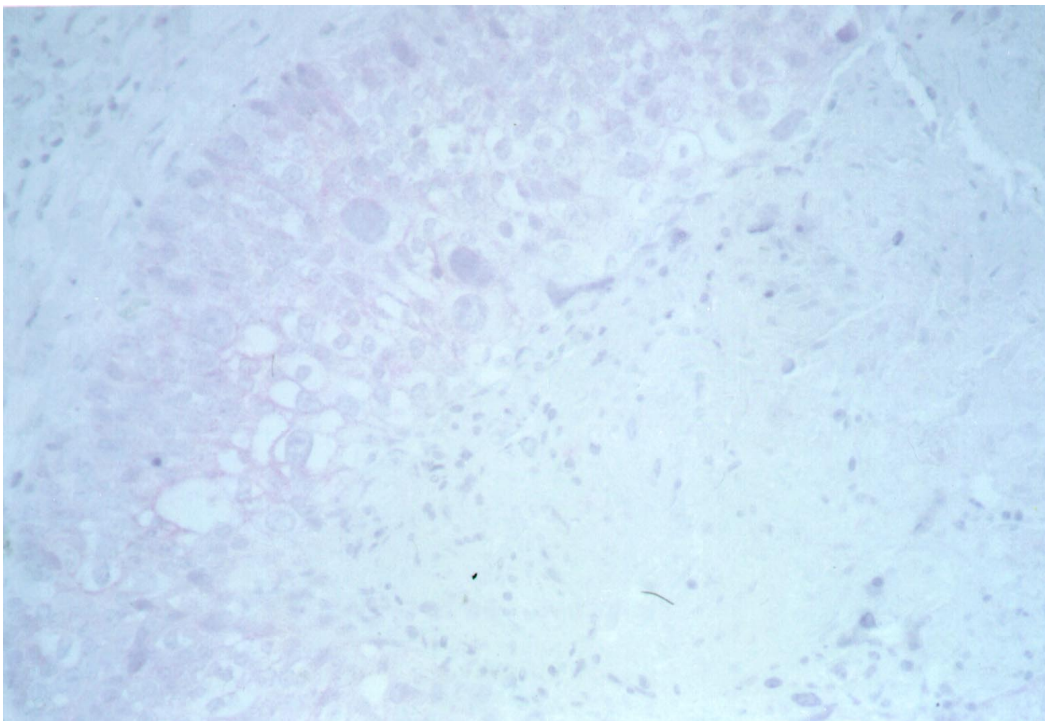


Abb. 62: In einem Fall eines gering differenzierten Plattenepithelkarzinoms (G3) war der immunhistologische Nachweis der CD44-Isoform v4 negativ. Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: BMS114, Klon VFF-11 / Chromogen: Fast-Red / Gegenfärbung: Hämalaun); Originalvergrößerung: 200x.

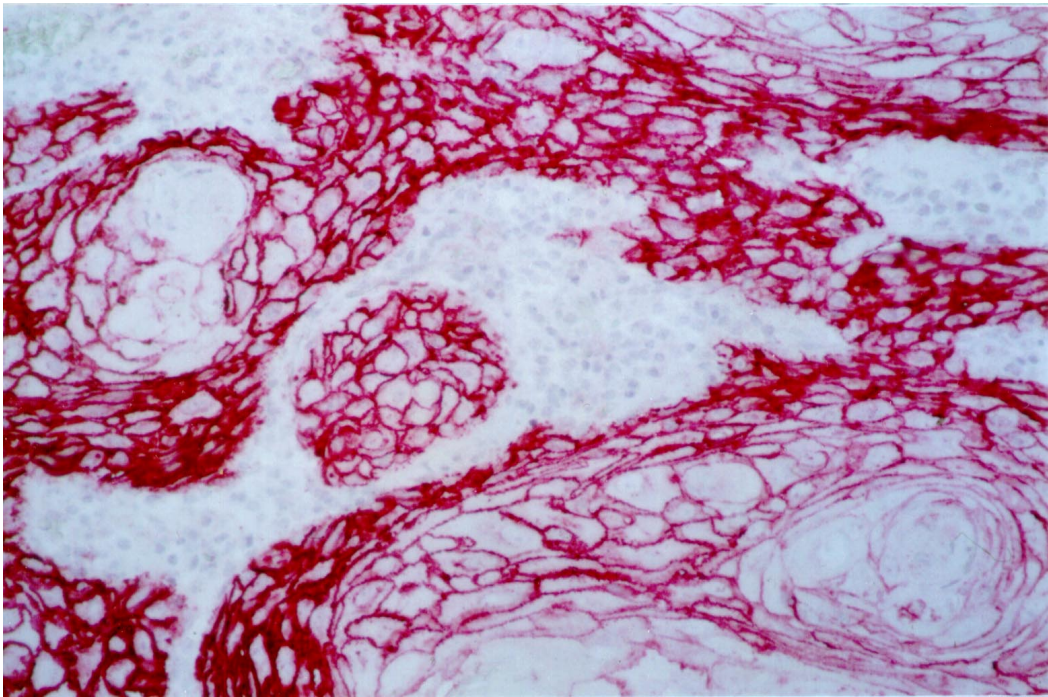


Abb. 63: Der immunhistologische Nachweis von CD44v4 war mit Ausnahme eines gering differenzierten Plattenepithelkarzinoms (Abb. 62) in allen Fällen positiv. Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: BMS114, Klon VFF-11 / Chromogen: Fast-Red / Gegenfärbung: Hämalaun); Originalvergrößerung: 200x.

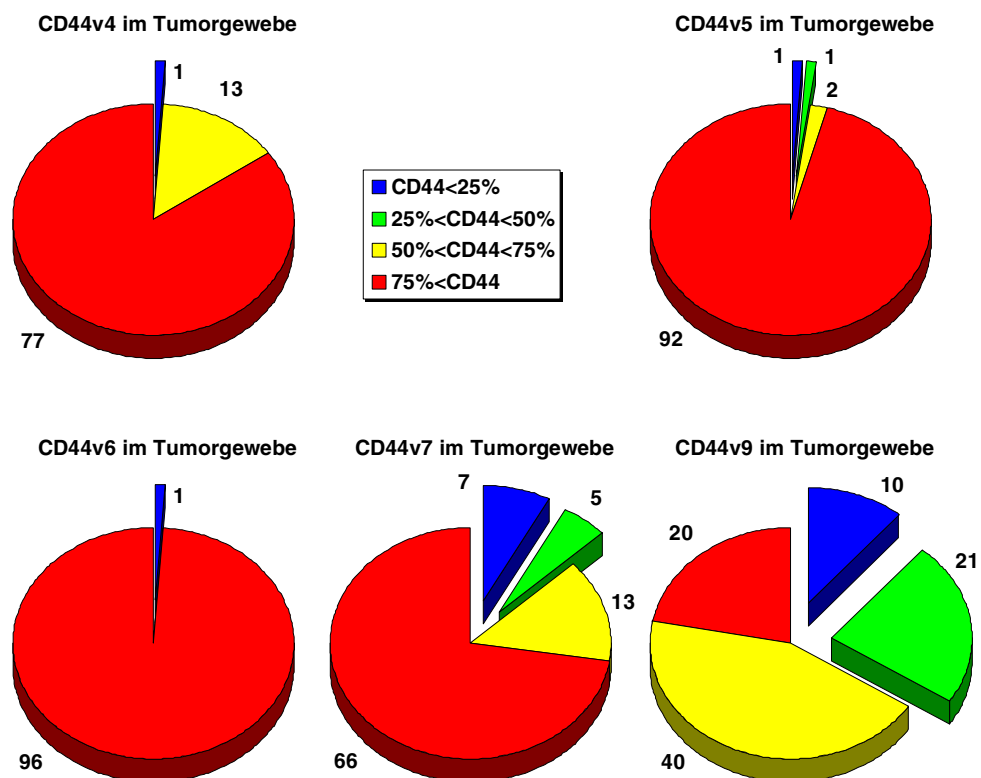


Abb. 64: Die Isoformen CD44v4, v5 und v6 waren mit einzelnen Ausnahmen in allen untersuchten Plattenepithelkarzinomen immunhistologisch nachweisbar. Dagegen zeigten sich beim Nachweis von CD44v7 und insbesondere CD44v9 häufiger verminderte Expressionen im Tumorgewebe.

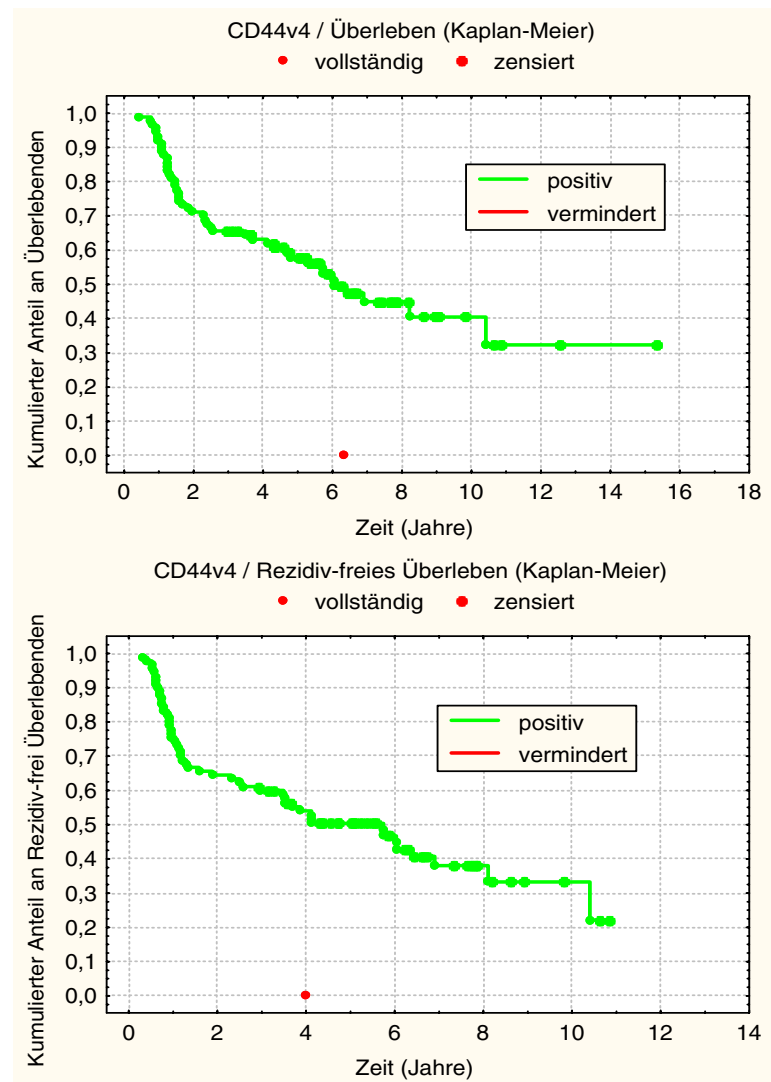


Abb. 65: Der immunhistologische Nachweis von CD44v4 war bei einem Patienten mit einem gering differenzierten Plattenepithelkarzinom (G3) vermindert gegenüber der Expression im Epithel. Dieser Patient bekam 4 Jahre postoperativ ein Tumorrezidiv und verstarb weitere 2 Jahre und 4 Monate später.

Der immunhistologische Nachweis der verschiedenen Isoformen des CD44 führte im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes wie beim E-Cadherin in allen Fällen, in denen solches Epithel auf den Gewebsschnitten miterfaßt war, zu einer membranösen Färbung im Stratum basale, spinosum und granulosum (Abb. 61). Im Tumorgewebe zeigten mit Ausnahme eines gering differenzierten Karzinoms (G3, Abb. 62) alle Tumoren ohne Unterschied zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen in mindestens der Hälfte der Tumorzellen einen positiven membranösen Nachweis von CD44v4 (Abb. 63 und Abb. 64). Der Patient mit dem negativen Ergebnis im Tumor bekam 4 Jahre postoperativ ein Tumorrezidiv und starb weitere 2 Jahre und 4 Monate später (Abb. 65). Nur in zwei Fällen von ebenfalls gering differenzierten Karzinomen (G3) war der Nachweis für CD44v5 in den Primärtumoren in weniger als der Hälfte oder sogar weniger als einem Viertel der Tumorzellen negativ (Abb. 64). Bei dem ersten Patienten wurde 3 Jahre und 6 Monate postoperativ ein Tumorrezidiv diagnostiziert, an dem er weitere 9 Monate später verstarb (Abb. 66). Der andere Patient war der einzige, bei dem auch der Nachweis von CD44v6 im Primärtumorgewebe negativ ausfiel (Abb. 64). Er bekam nach 10 Monaten ein Tumorrezidiv und starb 2 Monate später (Abb. 67). Die ebenfalls untersuchte Lymphknotenmetastase dieses Patienten war sowohl beim Nachweis von CD44v5 als auch von CD44v6 positiv. Ansonsten ergaben sich für beide Isoformen keine Unterschiede innerhalb der Primärtumoren, zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen und zwischen verschiedenen Lymphknotenmetastasen identischer Primärtumoren. Beim Nachweis von CD44v7 und CD44v9 zeigten sich häufiger verminderte Expressionen dieser Isoformen im Tumorgewebe als bei CD44v4-6 (Abb. 64). Während die Expression von CD44v7 unabhängig vom histopathologi-

schen Grading war (Mann-Whitney U-Test), ergab sich eine statistisch signifikante Korrelation vom Grading zur CD44v9-Expression, die um so häufiger vermindert war, um so geringer differenziert die Tumoren waren (Abb. 68, Mann-Whitney U-Test: $p < 0,001$). In 3 von 9 Fällen (33,3%) zeigten sich Differenzen in der CD44v9-Expression zwischen Primärtumoren und zugehörigen Lymphknotenmetastasen. Dabei war zweimal die Expression im Primärtumor positiv und in den Lymphknotenmetastasen vermindert, und umgekehrt exprimierte einmal nur die Lymphknotenmetastase CD44v9. Ansonsten ergaben sich sowohl für den Nachweis von CD44v7 als auch von CD44v9 keine Unterschiede innerhalb der Primärtumoren, zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen und zwischen verschiedenen Lymphknotenmetastasen identischer Primärtumoren.

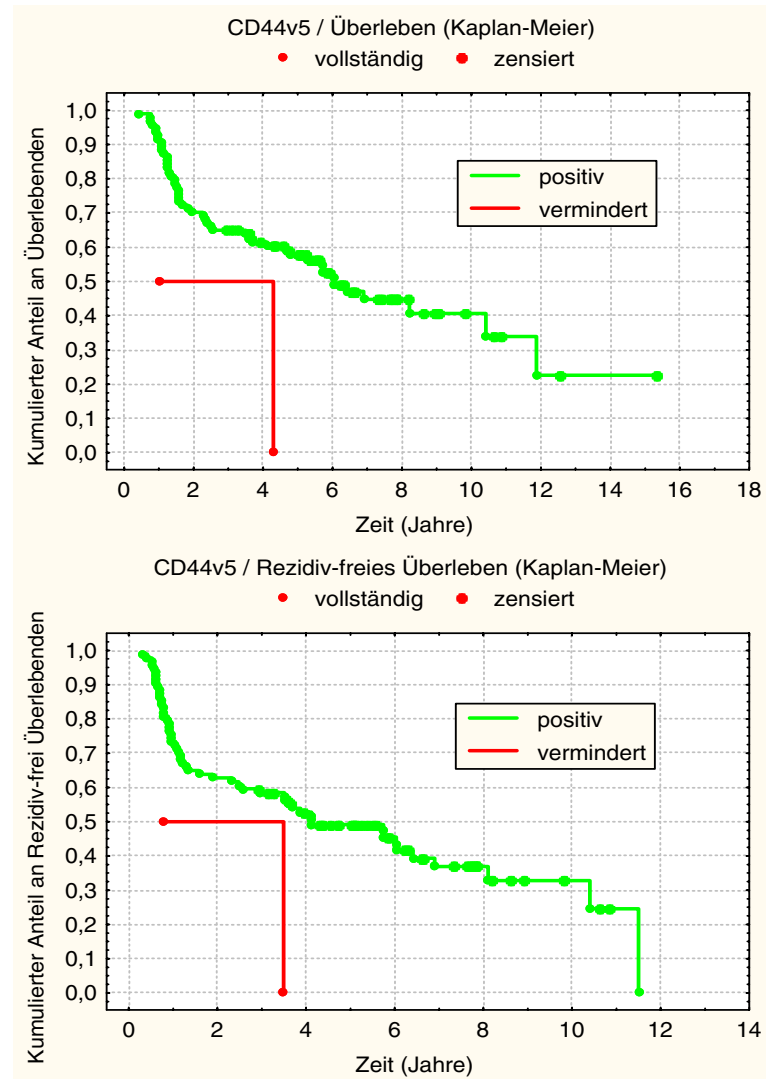


Abb. 66: Der immunhistologische Nachweis von CD44v5 war bei zwei Patienten mit gering differenzierten Plattenepithelkarzinomen (G3) vermindert. Der eine Patient bekam nach 10 Monaten ein Tumorrezidiv und starb weitere 2 Monate später, bei dem anderen wurde 3 Jahre und 6 Monate postoperativ ein Tumorrezidiv diagnostiziert und er verstarb weitere 9 Monate danach.

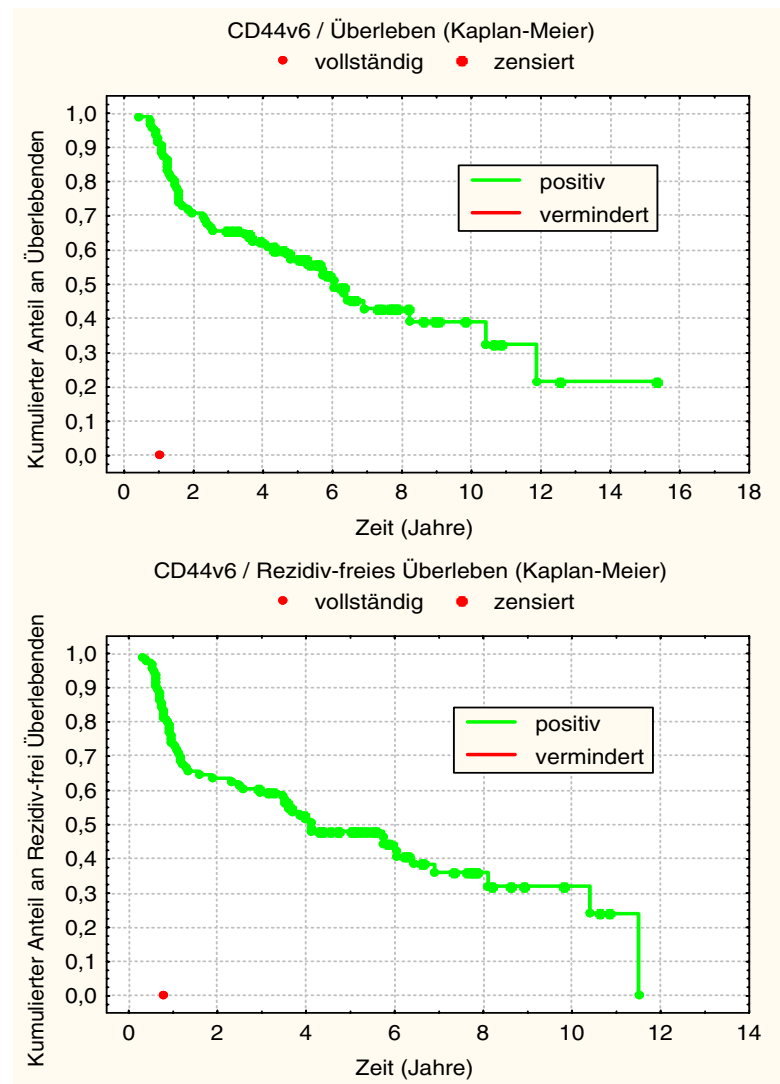


Abb. 67: Der immunhistologische Nachweis von CD44v6 war nur bei einem Patienten mit einem gering differenzierten Plattenepithelkarzinom im Vergleich zum Epithel vermindert. Er bekam 10 Monate post operationem ein Tumorrezidiv und verstarb weitere 2 Monate später.

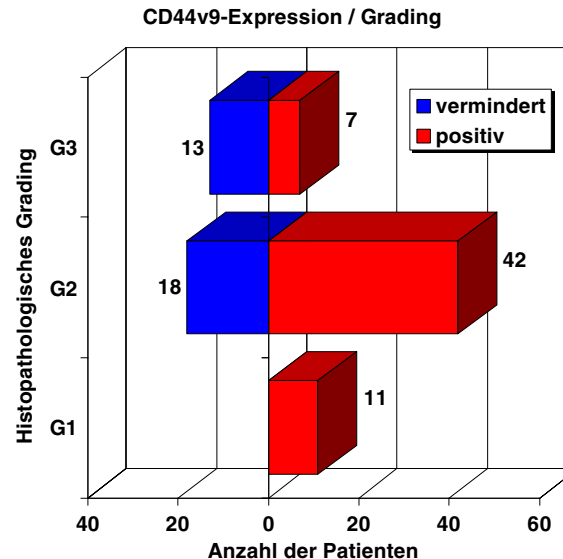


Abb. 68: Zwischen dem immunhistologischen Nachweis von CD44v9 und dem Tumor-Grading ergab sich eine signifikante Korrelation (Mann-Whitney U-Test: $p < 0,001$): Die CD44v9-Expression war um so häufiger vermindert, je geringer differenziert die Tumoren waren.

Die Ergebnisse des CD44-Nachweises im Tumorgewebe waren unabhängig von der Tumorlokalisation (Kruskal-Wallis-ANOVA), vom Alkohol- und Tabakabusus, dem Geschlecht (Mann-Whitney U-Test) und Alter der Patienten, der Tumorgroße pT, der Lymphknotenmetastasierung pN, dem Tumorstadium und den vorher hier aufgeführten, immunhistologisch bestimmten Parametern (Gamma-Test) einschließlich des Färbungsmusters beim Nachweis von E-Cadherin (Kruskal-Wallis ANOVA). Aber sowohl die CD44v7- als auch die CD44v9-Expression im Tumorgewebe zeigten einen signifikanten Einfluß auf das Überleben (CD44v7: $p < 0,05$, CD44v9: $p < 0,02$) und Rezidiv-freie Überleben (CD44v7: $p < 0,05$, CD44v9: $p < 0,02$) der Patienten nach Kaplan und Meier (Abb. 69 und Abb. 70). Insgesamt fiel in 39 von 99 auswertbaren Fällen (39,4%) der Nachweis von mindestens einer der hier ausgetesteten CD44-Isoformen im Tumorgewebe vermindert aus. Bei der univariaten Analyse des Überlebens ($p < 0,002$) und Rezidiv-freien Überlebens ($p < 0,005$) nach Kaplan und Meier ergab sich in diesen Fällen eine signifikant schlechtere Prognose gegenüber Patienten, bei denen alle untersuchten Isoformen positiv im Tumorgewebe getestet wurden (Abb. 71). In der multivariaten Analyse des Überlebens nach Cox unter Einschluß der Parameter Tumorgroße und -infiltration pT, Lymphknotenmetastasierung pN, histologisches Tumor-Grading G und verminderte Expression von mindestens einer der hier untersuchten CD44-Isoformen im Tumorgewebe waren nur pT (Wald-Statistik: $W=5,24$; $p < 0,03$), pN ($W=9,48$; $p < 0,003$) und die Bestimmung der Expression der CD44-Isoformen ($W=9,67$; $p < 0,002$) unabhängige Prognosefaktoren (Abb. 72). Für das Rezidiv-freie Überleben hatten in diesem Modell nur die Lymphknotenmetastasierung pN ($W=4,72$; $p < 0,03$) und die CD44-Expression ($W=6,14$; $p < 0,02$) unabhängige prognostische Bedeutung.

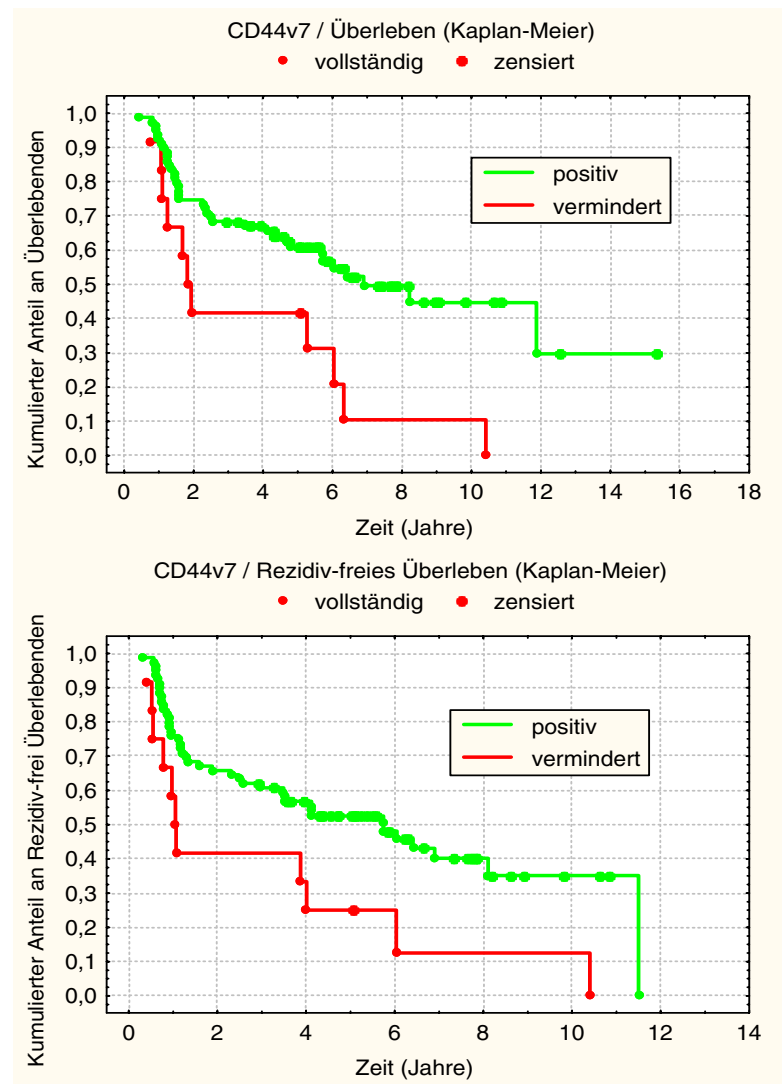


Abb. 69: Der immunhistologische CD44v7-Nachweis im Tumorgewebe zeigte einen signifikanten Einfluß auf das Überleben und Rezidiv-freies Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier ($p < 0,05$): Patienten mit einer verminderten Expression hatten die signifikant schlechtere Prognose.

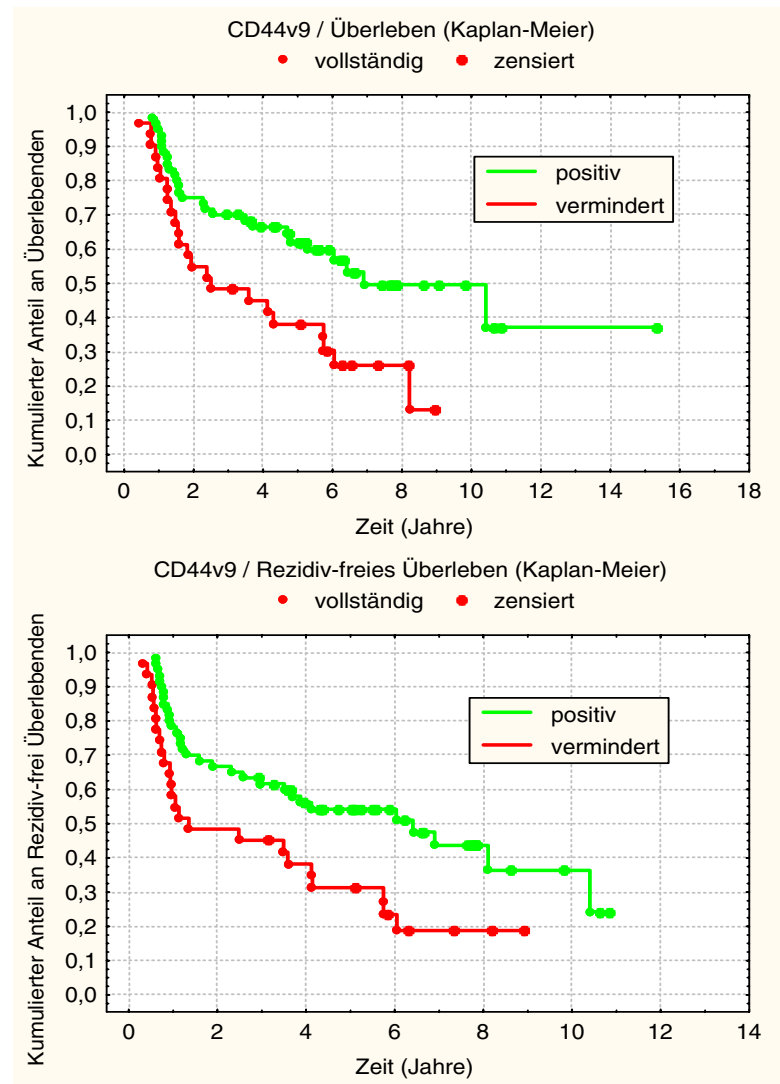


Abb. 70: Patienten mit einer verminderten CD44v9-Expression im Tumorgewebe hatten eine signifikant kürzere Überlebenszeit und Rezidiv-freie Überlebenszeit nach Kaplan und Meier als Patienten mit einer im Tumorgewebe gegenüber dem Epithel ebenfalls positiven Expression ($p < 0,02$).

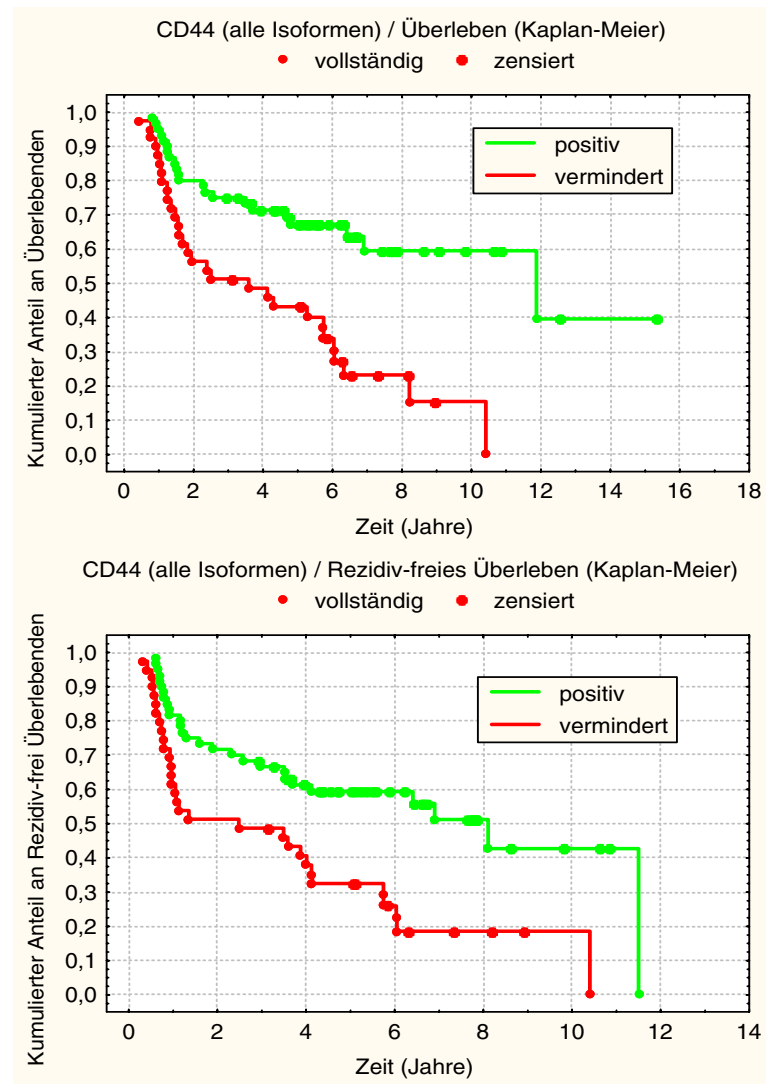


Abb. 71: Die Patienten, die bei allen ausgewerteten CD44-Isoformen eine positive Expression im Tumorgewebe zeigten, hatten verglichen mit denen (39,4%), die bei mindestens einer der untersuchten Isoformen eine verminderte Expression aufwiesen, ein signifikant günstigeres Überleben ($p < 0,002$) und Rezidiv-freies Überleben ($p < 0,005$) nach Kaplan und Meier.

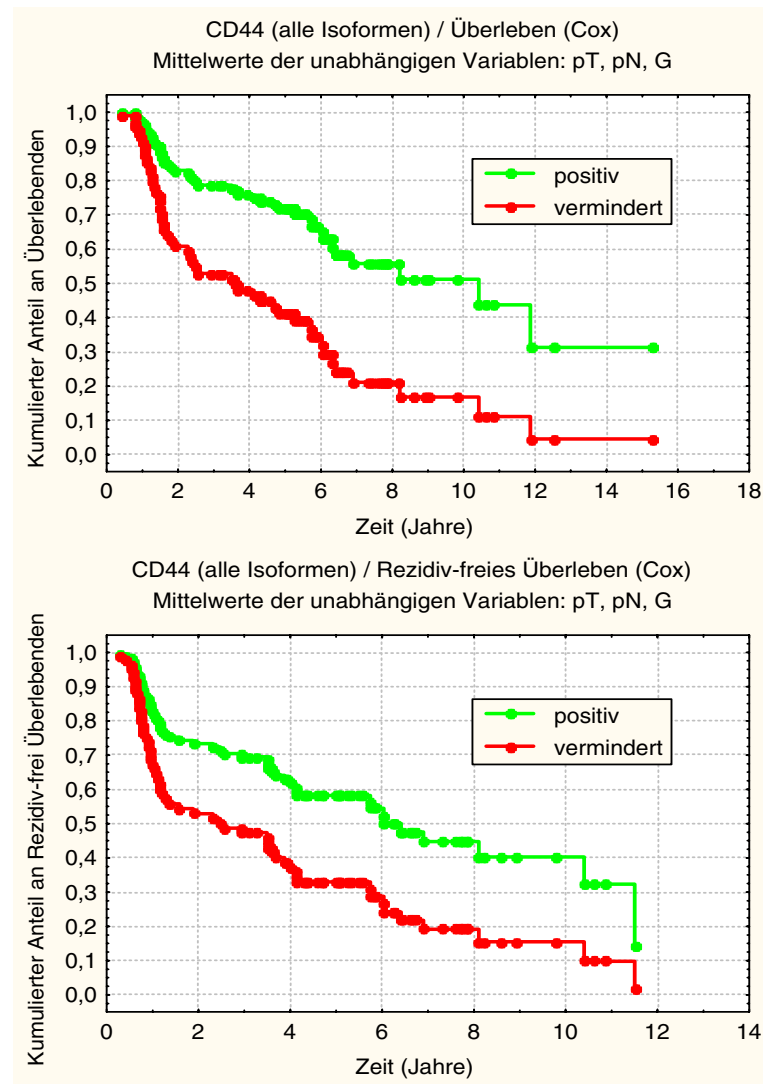


Abb. 72: In der multivariaten Analyse im Cox-Modell war die verminderte Expression von mindestens einer der hier untersuchten CD44-Isoformen ein unabhängiger Prognosefaktor für das Überleben ($p < 0,002$) neben der Tumorgroße und -infiltration ($p < 0,03$) und der Lymphknotenmetastasierung ($p < 0,003$) sowie für das Rezidiv-freie Überleben ($p < 0,02$) neben der Lymphknotenmetastasierung ($p < 0,03$).

4.1.11 Ki-67

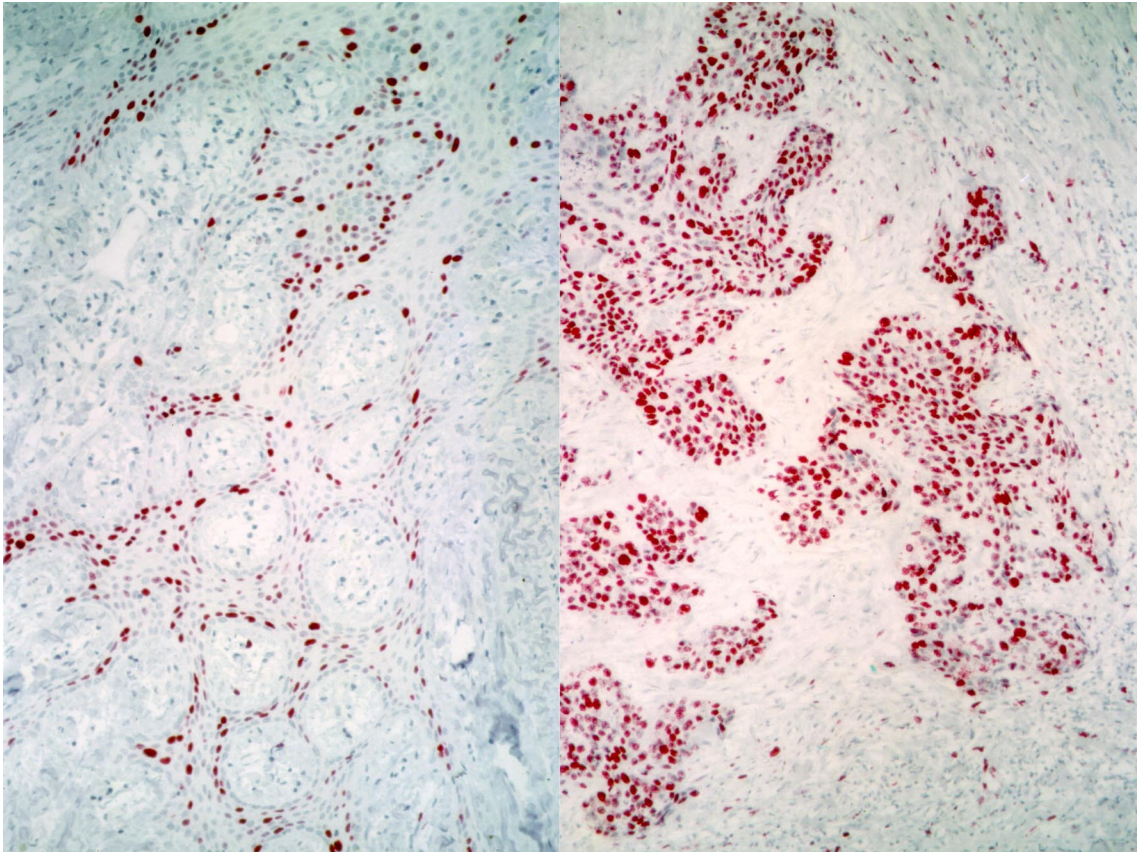


Abb. 73: Der Prozentsatz angefärbter Zellkerne beim immunhistologischen Nachweis von Ki-67 war bei verschiedenen Tumoren sehr unterschiedlich. Immunhistologische Färbung (Primärantikörper: dia 505, Klon MIB 1 / Chromogen: Fast-Red / Gegenfärbung: Hämalaun); Originalvergrößerung: 100x.

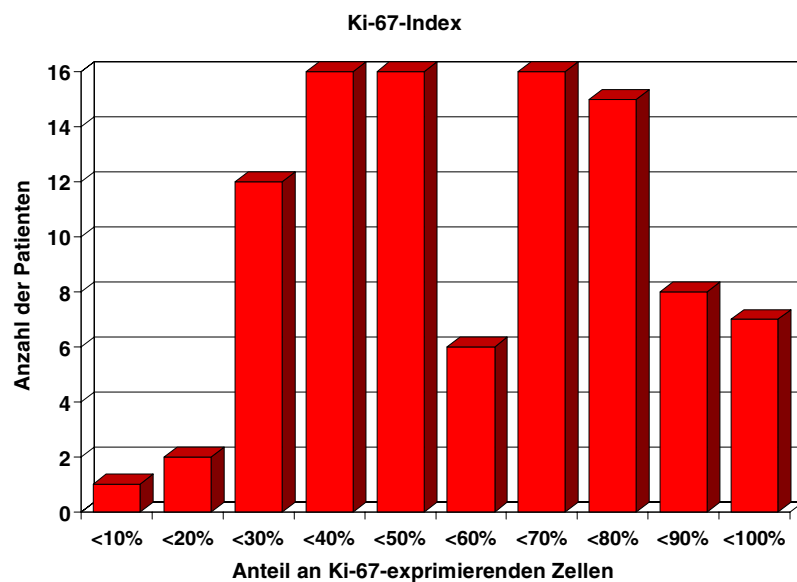


Abb. 74: Die Anteile der nukleär angefärbten Tumorzellen beim immunhistologischen Ki-67-Nachweis bewegten sich innerhalb des untersuchten Tumorkollektivs in einem weiten Rahmen.

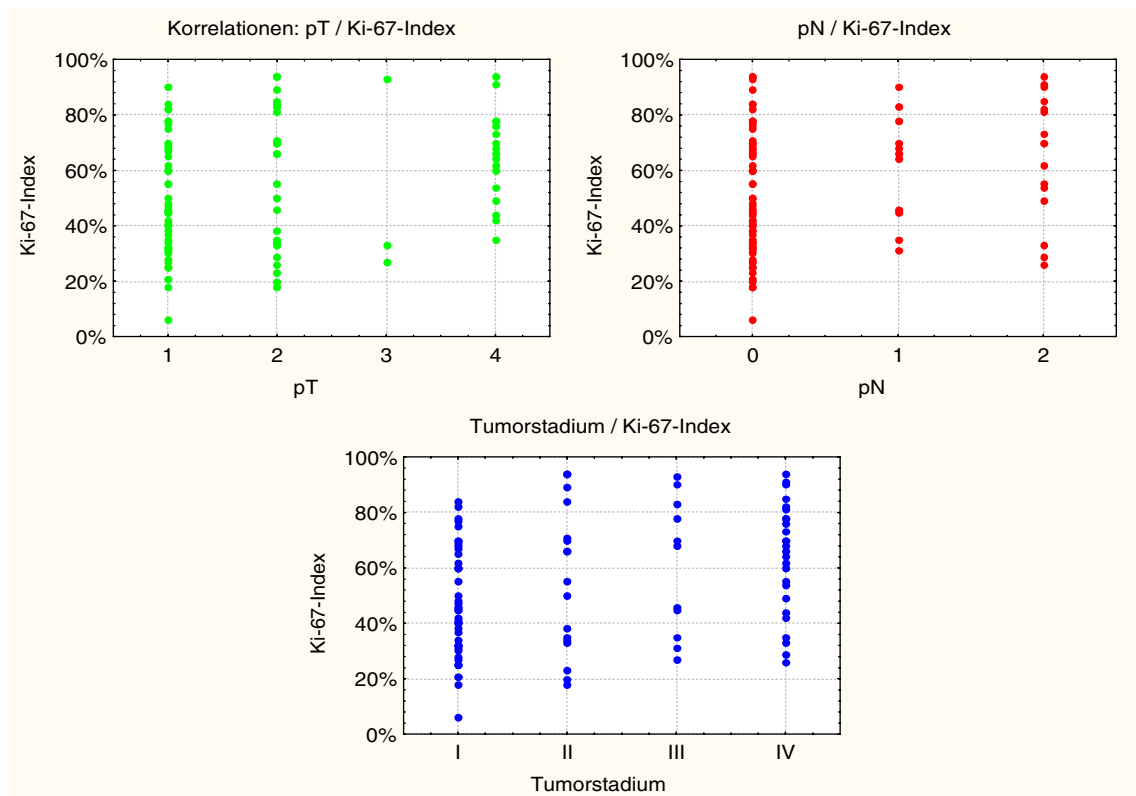


Abb. 75: Der Ki-67-Index war um so höher, je größer die Tumoren waren oder wenn die Tumoren benachbarte Strukturen infiltriert hatten (pT: Gamma-Test: $p < 0,006$) und je weiter die Lymphknotenmetastasierung vorangeschritten war (pN: Gamma-Test: $p < 0,002$). Damit ergab sich auch eine positive Korrelation zum Tumorstadium (Gamma-Test: $p < 0,001$).

Ki-67 war in sehr unterschiedlicher Häufigkeit in den Zellkernen des Tumorgewebes nachweisbar (Abb. 73 und Abb. 74). In 9 von 31 Fällen (29,0%), in denen mehrere Blöcke von einzelnen Primärtumoren untersucht werden konnten, war eine intratumorale Heterogenität durch Unterschiede im Ki-67-Index von mehr als 10% zwischen verschiedenen Blöcken von identischen Primärtumoren nachweisbar. In einem von 9 Fällen (11,1%), in denen Primärtumoren mit den zugehörigen Lymphknotenmetastasen verglichen werden konnten, war der Ki-67-Index im Primärtumor 35% und in der Lymphknotenmetastase 45%. Ansonsten ergaben sich wie zwischen verschiedenen Lymphknotenmetastasen keine Unterschiede.

Der Ki-67-Index war unabhängig von der Tumorlokalisation und dem E-Cadherin-Nachweis (Kruskal-Wallis-ANOVA), dem Alkohol- und Tabakabusus, dem Geschlecht (Mann-Whitney U-Test) und Alter der Patienten, dem immunhistologischen Nachweis von p53, p90^{MDM2}, p21^{CIP}, p16^{INK4a}, Cyclin D1, BCL-2, BAX und CD44 und dem histopathologischen Tumor-Grading G (Gamma-Test). Es ergab sich aber eine positive Korrelation zum Tumor-Staging: Der Ki-67-Index war um so höher, je größer die Tumoren waren (pT: Gamma-Test: $p < 0,006$) und je weiter die Lymphknotenmetastasierung vorangeschritten war (pN: Gamma-Test: $p < 0,002$). Damit ergab sich auch eine positive Korrelation zum Tumorstadium (Abb. 75, Gamma-Test: $p < 0,001$). Der Einfluß des Ki-67-Index im Tumorgewebe auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier war nicht signifikant, obwohl erkennbar war, daß Patienten mit einem Ki-67-Index im Tumorgewebe unter 25% günstiger und mit einem Ki-67-Index über 75% tendenziell ungünstiger lagen als die übrigen Patienten (Abb. 76). Weiterhin ergab sich eine positive Korrelation zwischen dem Ki-67-Index und dem immunhistologischen Nachweis von pRB im Tumorgewebe (Abb. 77, Gamma-Test: $p < 0,001$).

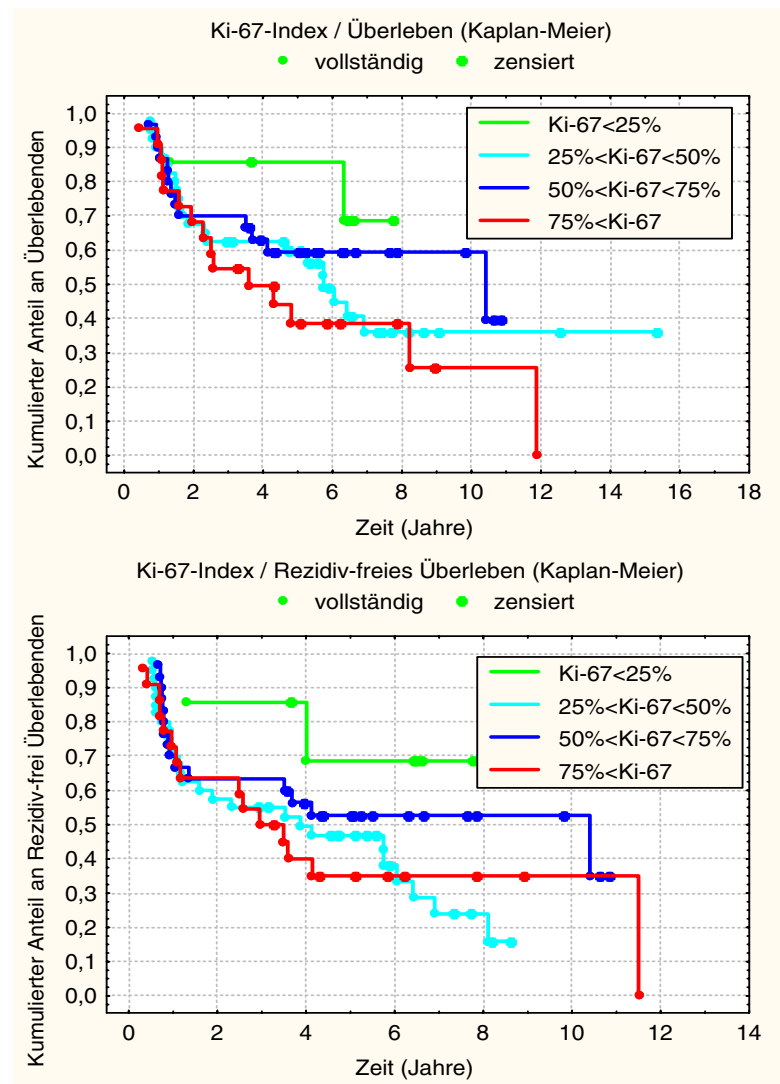


Abb. 76: Der Einfluß des Ki-67-Index auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier war nicht signifikant, obwohl erkennbar war, daß die Patienten mit einem Ki-67-Index von unter 25% im Tumorgewebe sowohl beim Überleben als auch beim Rezidiv-freien Überleben günstiger und die Patienten mit einem Ki-67-Index von über 75% im Tumorgewebe bezüglich des Überlebens tendenziell ungünstiger lagen als die übrigen Patienten.

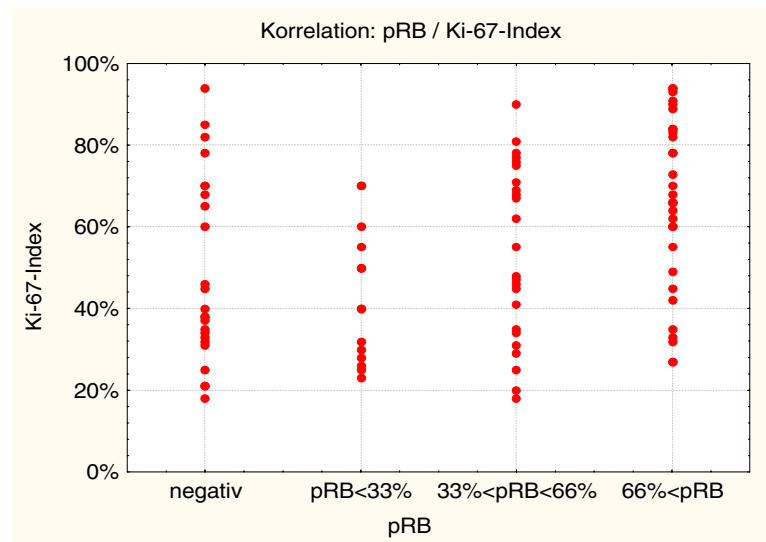


Abb. 77: Der Ki-67-Index im Tumorgewebe war signifikant positiv mit dem immunhistologischen Nachweis von pRB verknüpft (Gamma-Test: $p < 0,001$).

4.2 Apoptosenachweis

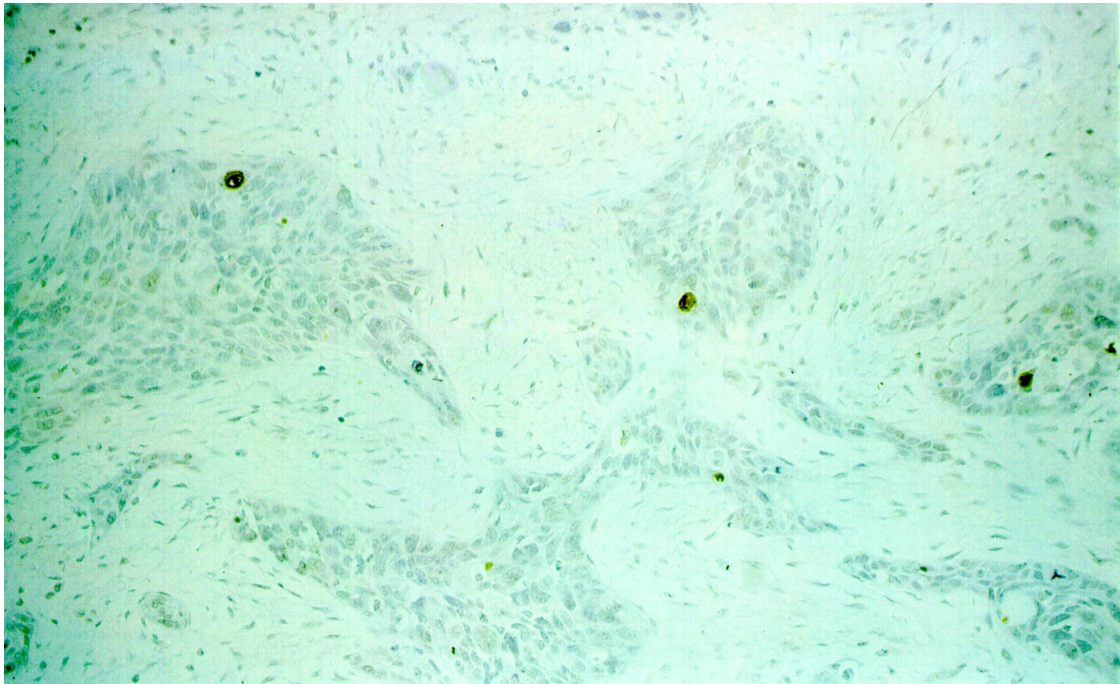


Abb. 78: Im Tumorgewebe konnten mit Hilfe einer terminalen Transferase-Reaktion wenige apoptotische Zellen nachgewiesen werden. Färbung von DNA-Fragmenten mit dem ApopTag-Kit (Chromogen: Diaminobenzidin / Gegenfärbung: Methylgrün); Originalvergrößerung: 100x.

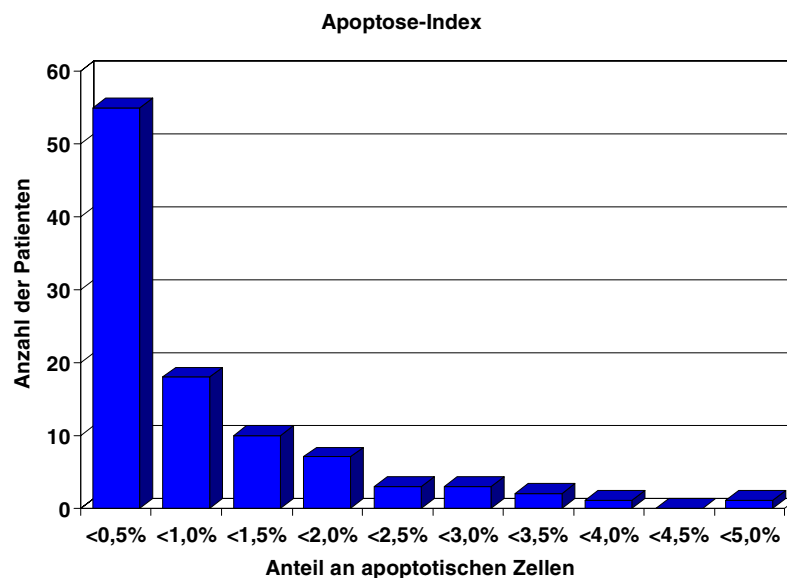


Abb. 79: Die Bandbreite der Resultate bei der Bestimmung des Apoptose-Index reichte von Fällen mit im Tumorgewebe nicht nachweisbarer Apoptose bis hin zu einem Fall mit einem Apoptose-Index von 5%.

In über der Hälfte der Fälle (55,0%) konnten nur wenige apoptotische Zellen im Tumorgewebe nachgewiesen werden (Apoptose-Index < 0,5%, Abb. 78 und Abb. 79). Die Bandbreite der Resultate reichte von Fällen mit nicht nachweisbarer Apoptose bis hin zu einem Fall mit einem Apoptose-Index von 5%. Die höheren Apoptoseraten waren aber eher selten. In wiederum 3 von 31 Fällen (9,7%), in denen mehrere Blöcke von einzelnen Primärtumoren miteinander verglichen werden konnten, konnten Differenzen von mehr als 1% im Apoptose-Index zwischen verschiedenen Blöcken von ein und demselben Primärtumor als Zeichen einer intratumoralen Heterogenität nachgewiesen werden. Differenzen zwischen Primärtumoren und zugehörigen

Lymphknoten oder zwischen verschiedenen Lymphknotenmetastasen eines Tumors wurden nicht gefunden.

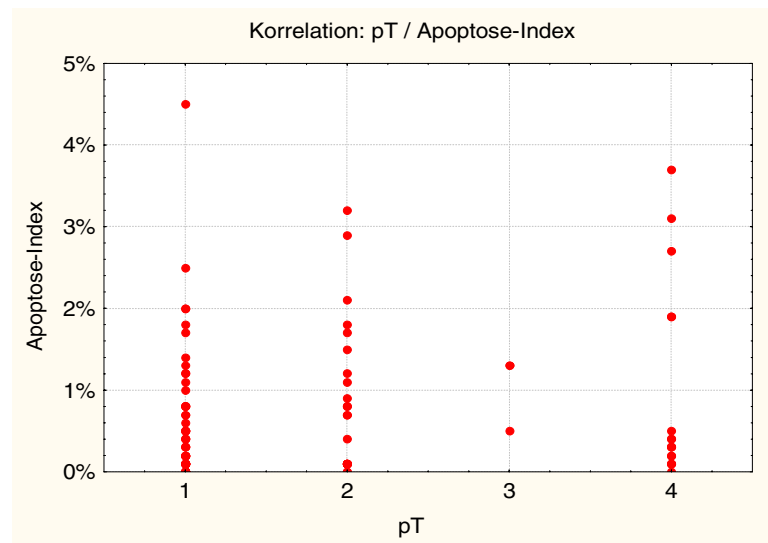


Abb. 80: Zwischen dem Apoptose-Index und der Tumorgöße und -infiltration pT ergab sich ein signifikant positiver Zusammenhang (Gamma-Test: $p < 0,03$).

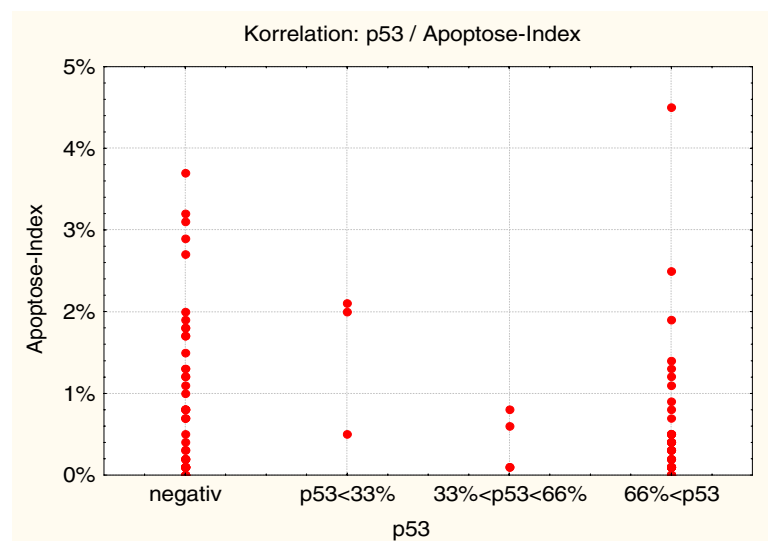


Abb. 81: Zwischen einem positiven immunhistologischen Nachweis von p53 im Tumorgewebe und einem geringen Apoptose-Index war eine signifikante Korrelation nachweisbar (Gamma-Test: $p < 0,003$).

Der Apoptose-Index im Tumorgewebe war unabhängig von der Tumorlokalisation (Kruskal-Wallis-ANOVA), dem Alkohol- und Tabakabusus, dem Geschlecht (Mann-Whitney U-Test) und Alter der Patienten, der Lymphknotenmetastasierung pN, dem Tumorstadium und dem histopathologischen Grading G (Gamma-Test). Es gab aber einen positiven Zusammenhang zwischen der Tumorgöße pT und dem Apoptose-Index (Abb. 80, Gamma-Test: $p < 0,03$). Außerdem war einerseits eine signifikante Korrelation zwischen positivem immunhistologischen Nachweis von p53 und einer geringeren Apoptoserate (Abb. 81, Gamma-Test: $p < 0,003$) nachweisbar, andererseits war insbesondere der positive BCL-2-Nachweis und der fehlende BAX-Nachweis mit einem geringen Apoptose-Index verknüpft (Abb. 82, Gamma-Test: $p < 0,001$). Zusätzlich war ein positiver Zusammenhang zwischen dem Apoptose-Index und dem positiven Nachweis von Cyclin D1 im Tumorgewebe erkennbar (Abb. 83, Gamma-Test: $p < 0,01$). Ein Einfluß des Apoptose-Index im Tumorgewebe auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier war nicht nachweisbar (Abb. 84).

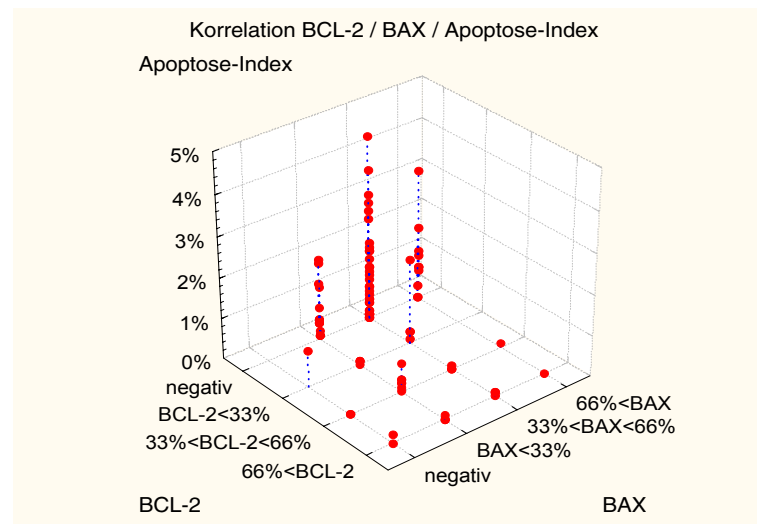


Abb. 82: Ein positiver immunhistologischer BCL-2-Nachweis und ein fehlender BAX-Nachweis waren mit einem geringen Apoptose-Index im Tumorgewebe verknüpft (Gamma-Test: $p < 0,001$).

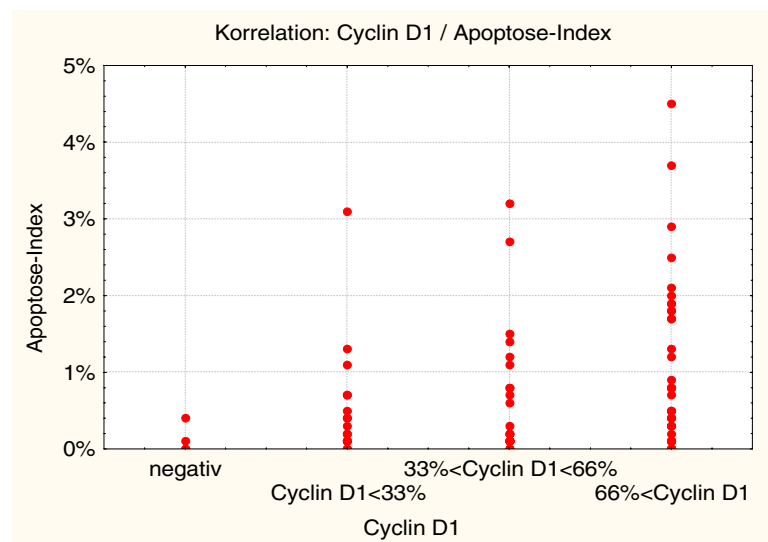


Abb. 83: Zwischen dem Apoptose-Index und dem immunhistologischen Nachweis von Cyclin D1 im Tumorgewebe war ein signifikant positiver Zusammenhang nachweisbar (Gamma-Test: $p < 0,01$).

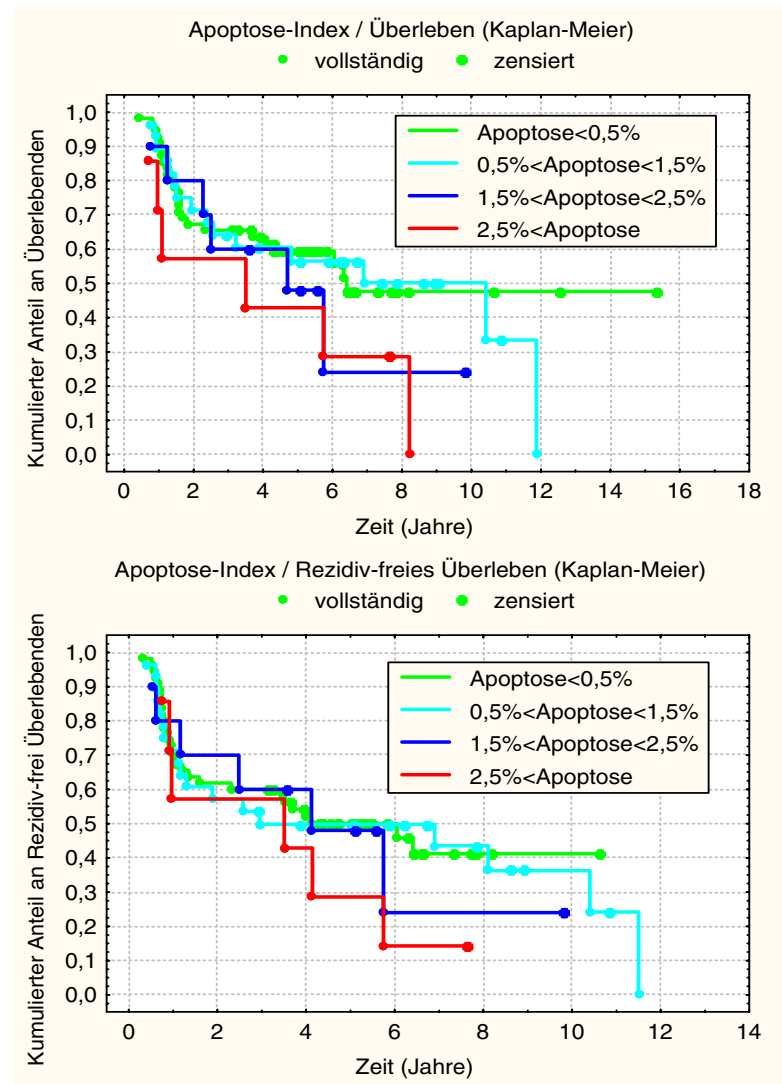


Abb. 84: Ein Einfluß des Apoptose-Index im Tumorgewebe auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier war nicht erkennbar.

5 Diskussion

5.1 Klinische und kausale Aspekte der Kanzerogenese

Bei dem Patientengut dieser Studie fanden sich typische Merkmale von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx. So entsprach die Altersverteilung der Patienten (Abb. 12) den bisherigen Erhebungen, die in neueren Untersuchungen einen Altersgipfel von 50 bis 60 Jahren, in älteren Untersuchungen einen Altersgipfel von 60 bis 70 Jahren zeigten [20, 174]. Ebenso war die höhere Inzidenz für das männliche Geschlecht wie auch der frühere Erkrankungsbeginn bei Männern gegenüber Frauen am vorliegenden Patientengut nachweisbar (Abb. 12). Das mittlere Erkrankungsalter lag 1997 in der Bundesrepublik Deutschland für die 7200 betroffenen Männer bei 57,5 Jahren und für die 2500 erkrankten Frauen bei 63,0 Jahren [217]. Die Bedeutung der bekannten Risikofaktoren Rauchen und Alkoholabusus war ebenfalls nachvollziehbar (Abb. 13) [145, 291], wobei zusätzlich zu berücksichtigen ist, daß diese Daten lediglich retrospektiv anhand der vorliegenden Krankenunterlagen erhoben wurden. Der tatsächliche Anteil an Rauchern und Alkoholkonsumenten am Patientengut dürfte erfahrungsgemäß noch höher liegen. Die ungleiche Verteilung der Risikofaktoren Rauchen und Alkoholabusus auf Männer und Frauen kann eine Erklärung für die höhere Inzidenz von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx bei Männern liefern. Ebenso typisch für diese Tumorentität ist die Verteilung der Tumoren innerhalb der Mundhöhle und des Oropharynx mit Bevorzugung des Mundbodens (Tab. 1) [20, 174], da hier ein besonders intensiver und lange andauernder Kontakt von kanzerogenen Noxen mit dem Plattenepithel der Schleimhaut stattfinden kann. Auch die bekannte Tatsache, daß Patienten mit Karzinomen im anterioren Bereich der Mundhöhle eine bessere Prognose besitzen als solche mit Karzinomen im dorsalen Bereich [20, 174], war im untersuchten Patientenkollektiv tendenziell erkennbar (Abb. 14). Statistisch signifikante Unterschiede waren jedoch nicht auszumachen. Da sich Karzinome der Mundhöhle, der Zunge und des Oropharynx hinsichtlich der Geschlechts- und Altersverteilung und der Überlebensraten sehr ähnlich verhalten, Plattenepithelkarzinome der Lippen jedoch eine andere Ätiologie (Sonneneinstrahlung, Pfeifenraucher), Geschlechts- und Altersverteilung, eine wesentlich geringere Metastasierungstendenz und eine deutlich bessere Prognose haben, wurden Plattenepithelkarzinome der Lippen von dieser Untersuchung ausgeschlossen, um ein möglichst homogenes Patientenkollektiv zu erhalten [148].

Bei der Ätiologie von Tumoren sind endogene und exogene Faktoren zu berücksichtigen. Durch sie kommt es in der initialen Phase der Kanzerogenese zu Mutationen an Protoonkogenen mit Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und damit zu einer Transformation von Zellen [44, 92, 194]. Diese können bei irreversibler Transformation anschließend als Tumorzellen ein weitgehend ungehemmtes, autonomes und zumindest in den frühen Stadien monoklonales Wachstum zeigen.

Die Bedeutung von endogenen Faktoren für die Kanzerogenese ist unstrittig. So ist eine genetische Disposition bei verschiedenen Tumoren des menschlichen Organismus in unterschiedlichem Ausmaß nachgewiesen [61]. Zu den Erbkrankheiten, die mit einem erhöhten Risiko einhergehen, an Krebs zu erkranken, zählen die Fanconi-Anämie, das Bloom-Syndrom, das Gardner-Syndrom, die Ataxia teleangiectasia, die Neurofibromatose Recklinghausen, das Basalnävussyndrom, die familiäre Adenomatosis coli, das Lynch-Syndrom, das Xeroderma pigmentosum, das Retinoblastom und letztlich auch das seltene Li-Fraumeni-Syndrom [92, 155, 162]. Für einen Teil der Mammakarzinome ist ebenfalls eine hereditäre Disposition bekannt [61]. Es gibt auch Hinweise, daß eine gestörte zelluläre Immunität eine Tumorentstehung begünstigt, indem sich Tumorzellen dem Zugriff des Immunsystems zumindest zeitweilig entziehen können und der „Immuno-Surveillance“, der immunologischen Überwachung, entgehen [20, 174]. So wird eine erhöhte Tumorzinzidenz bei Patienten mit genetisch bedingtem oder erworbenem (HIV) Immundefekt und mit medikamentös induzierter (Transplantatträger) wie auch alimentär bedingter (chronischer Alkoholabusus) Immunsuppression gefunden. Durch eine äthyltoxische Leberschädigung wird außerdem die chemische Entgiftungsfunktion der Leber und die zelluläre Abbaufunktion des retikuloendothelialen Systems negativ beeinflusst. Auch einem Mangel an verschiedenen Vitaminen, insbesondere den Vitaminen A und B, und an Spurenelementen, wie zum Beispiel Selen, wird eine kokanzerogene Wirkung zugesprochen [20, 174].

Der große Einfluß von exogenen Faktoren auf die Kanzerogenese wird insbesondere dadurch deutlich, daß Karzinome beim Menschen etwa zwanzigmal so häufig vorkommen wie Sarkome, obwohl der menschliche Körper sich zu etwa fünf Sechstel aus mesenchyalem Gewebe auf-

baut, woraus bei maligner Entartung Sarkome entstehen [83]. Nur zu etwa einem Sechstel besteht der Körper aus epitheliale Gewebe, das die äußeren und inneren Oberflächen des Körpers bedeckt und damit erheblich intensiver äußeren, direkt einwirkenden Einflüssen ausgesetzt ist als das mesenchymale Gewebe. Eine maligne Entartung des Epithels führt zur Entstehung von Karzinomen [83]. Als exogene kanzerogene Faktoren kommen überwiegend physikalische, chemische und biologische, das heißt durch Erreger verursachte Noxen in Betracht, die als Auslöser bei der Tumorentstehung, das heißt als Kanzerogene wirken. Mutagene Kanzerogene führen zu Veränderungen der DNA. Kanzerogene, die keine nachweisbaren Veränderungen der DNA bewirken, werden als epigenetische Kanzerogene bezeichnet. Dabei summieren sich im Laufe des Lebens auch unterschwellige Reize, die allein nicht zur Tumorentstehung ausreichen. Bei Überschreiten der Reizschwelle durch die Summation der Reize kann auch nach langer Latenzzeit ein Geschwulstwachstum ausgelöst werden (Synkarzinogenese) [83]. Dadurch ist die bei den meisten Tumorentitäten wie auch beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und des Oropharynx beobachtete ansteigende Tumorzinzidenz im höheren Lebensalter zu erklären. Neben Kanzerogenen spielen Kokanzerogene, die den Effekt von Kanzerogenen verstärken ohne selbst kanzerogen bzw. initiiierend zu wirken, und Promotoren, die die Progression einer initiierten Zelle bis zum klinisch manifesten Tumor fördern, eine Rolle. Verbindungen, die gleichzeitig Initiator- und Promotoreigenschaften besitzen, werden komplette Kanzerogene, nur initiiierend wirkende Kanzerogene inkomplette Kanzerogene genannt [225].

Unter den physikalischen Noxen sind insbesondere aktinische Faktoren wie ionisierende Strahlung, die unter anderem eine direkte Schädigung des Genoms durch Doppelstrangbrüche der DNA bewirken und ein sogenanntes Strahlenkarzinom zur Folge haben kann, und ultraviolette Strahlung, die zur Dimerentstehung von Pyrimidin-Basen in der DNA führen kann, von Bedeutung [20, 82]. Auch radioaktive Substanzen können durch ihre α -, β - oder γ -Strahlung zu DNA-Veränderungen führen. Ferner gelten Fasern jeder Substanz, die vom Organismus nicht abgebaut werden können, als kanzerogen, wenn sie eine Länge von 8 bis 200 μm und einen Durchmesser von maximal 1,5 μm aufweisen (Asbest) [20]. Möglicherweise wird durch solche Partikel der regelrechte Ablauf von interzellulären Interaktionen gestört. Als kokanzerogene physikalische Faktoren kommen beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und des Oropharynx chronische, immer wiederkehrende, mechanische oder thermische Einflüsse auf das Gewebe wie lang andauernde, rezidivierende Traumatisierungen der Mukosa durch scharfe Zahn- und Füllungskanten mit anschließender Geweberegeneration, chronische, rezidivierende Verbrennungen durch heißen Tabakrauch und Ablösen protektiv wirkender oberflächlicher Faktoren der Mukosa durch hochprozentigen Äthylalkohol in Betracht. Hochprozentiger Äthylalkohol wirkt dabei zusätzlich direkt lokal zellschädigend und dient als Vektor für Kanzerogene [291].

An chemischen Faktoren sind schon seit langem polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Tabakrauch), N-Nitrosoverbindungen (Tabakrauch), aromatische Amine, alkylierende Substanzen wie Senfgas und Äthylenimine, Urethan, halogenierte aliphatische Kohlenwasserstoffe, verschiedene Kunststoffe vor allem als Monomere und anorganische Substanzen wie Arsen (Tabakrauch), Cadmium und Chrom als Kanzerogene bekannt, wobei diese Liste durch verbesserte Analysetechniken und detaillierte Untersuchungen sicher weiter anwachsen wird (Tab. 15) [225]. Hierbei ist hauptsächlich von einer Kanzerogenese durch chemische Reaktion der Verbindungen (primäre oder direkt wirkende Kanzerogene) oder ihrer Metaboliten (sekundäre oder indirekt wirkende Kanzerogene oder Prokanzerogene) mit der DNA als ultimates Kanzerogen und der daraus resultierenden Veränderung des Genoms auszugehen [189].

Tab. 15: Auswahl humanpathogener Kanzerogene.

Stoffklasse	Kanzerogene	Wirkung
Alkylanzien		
(chemisch und strukturell heterogene, jedoch sämtlich alkylierende Substanzen; meist synthetisch; Therapeutika, insbesondere Zytostatika; auch für Tierexperimente)	Bis(chloromethyl)äther, Diepoxybutan, Glycinaldehyd, β -Propionolacton, Stickstoff-Lost	systemisch, lokal

anorganische Substanzen

(wirksam durch ihre Ionen; auch gewerblich = Berufs-Kanzerogene)	Arsen, Chrom, Nickel	lokal
--	----------------------	-------

als physikalische Kanzerogene:	Polonium, Radium, Uran
--------------------------------	------------------------

Kanzerogene zur tierexperimentellen Auslösung von Tumoren:	Beryllium, Blei, Cadmium
--	--------------------------

aromatische Amine

(als chemische Syntheseprodukte; auch tierexperimentell genutzt)	4-Aminobiphenyl, 2-Aminoanthracen, 2-Aminonaphthalin, 2-Aminophenanthren, Benzidin, 2-Naphthylamin, o-Toluidin	systemisch, organotrop
--	--	------------------------

analog Pyrolyse-Produkte von Aminosäuren:	Tryptophan- und Glutaminsäure-Heterozyklen (Trp-P-1, Glu-P-1)
---	---

aromatische Kohlenwasserstoffe

	Benzo(a)pyren, 1,2-5,6-Dibenzanthracen, 7,12-Dimethylbenzanthracen, 3-Methylcholanthren	bevorzugt lokal
--	---	-----------------

als Berufskanzerogene:	Anthracenöl, Asphalt, Auramin, Benzinmotor-Abgase, Benzol, Bohröl, Dieselöl und -abgase, Ölschieferprodukte, (Roh-)Paraffinöl, Pech, Ruß, Schmierfett und -öl
------------------------	---

Festkörper

(kanzerogene Wirkung bedingt durch Größe, Form und Biobeständigkeit)	Asbestfasern, Kunststoff-, Glasfasern	lokal
--	---------------------------------------	-------

Naturstoffe

Aflatoxine, Aristolochia-Säure (in Osterluzei), Cycasin (in Cycadennüssen; Asien), Pyrrolizidinalkaloide (in Senecio, Crotalaria), Safrol

N-Nitroso-Verbindungen

Nitrosamine, Nitrosamide	systemisch, organotrop
--------------------------	------------------------

Einen weiteren Komplex von exogenen Faktoren in der Kanzerogenese bilden Parasiten und andere Krankheitserreger [225]. Bei den Parasiten spielt wohl der durch sie verursachte, andauernde Entzündungsreiz als Kokanzerogen eine Rolle, in dessen Folge es über Fehlregenerationen des Epithels ausgelöst durch Kanzerogene zur Krebsentstehung kommen kann. In gleicher Weise kann sich eine bakterielle oder durch Pilze verursachte Entzündung (Soor) auswirken, wobei allerdings Stoffwechselprodukte der Erreger wie das Aflatoxin B1 aus *Aspergillus flavus* auch direkt kanzerogen wirken können. Ungefähr 25% der bisher entdeckten 600 für Menschen und Tiere pathogene Viren sind potentielle Tumoviren. Onkogene DNA- und RNA-Viren können eine direkte Transformation von Zellen bewirken, indem ihre Gene in das Zellgenom integriert werden. Humanpathogene transformierende DNA-Viren sind einige humane Papilloma-Viren, insbesondere Typ 16 und 18 (High-risk-HPV-Infektionen), die häufig in Plattenepithelkarzinomen und dysplastischen Läsionen der Cervix uteri aber auch der Mundhöhle und des Oropharynx gefunden werden [177], das Epstein-Barr-Virus und das Hepatitis-B-Virus. Im Tier-

versuch weisen das SV40-Papovavirus und einige Adenoviren eine kanzerogene Wirkung auf. Onkogene RNA-Viren (Retroviren) sind beim Menschen die humanen T-Zell-Leukämie-Viren (HTLV-I und -II) [225].

Bemerkenswert bei dem untersuchten Patientenkollektiv ist der hohe Anteil von dysplastischem Epithel außerhalb des infiltrierend wachsenden Tumorgewebes, der auf den vorhandenen Schnitten miterfaßt wurde und die Bedeutung der multifokalen Kanzerogenese oder Feldkanzerisierung für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx unterstreicht [39, 188]. In einem Organ oder System können gleichzeitig (synchron) oder nacheinander (metachron) in Form von einer multifokalen Krebsentstehung mehrere primäre Tumorerde entstehen [82]. Dieser Mechanismus ist besonders typisch für die Kolonkarzinome bei der Adenomatosis coli, wird aber auch beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und des Oropharynx im Rahmen einer Feldkanzerisierung beobachtet [39, 188]. Zweitkarzinome in den Bronchien, in der Lunge, im Magen, im Rektum und im Uterus werden beim primären Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und des Oropharynx in 3,2-5,9% der Fälle angegeben [20].

Bei der klinischen Beobachtung können sich Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Oropharynx zwar aus (scheinbar) intakter Schleimhaut entwickeln. Häufig gehen jedoch der Karzinomentstehung verschiedene Formen von Präkanzerosen voraus (Abb. 1) [82]. Als wichtigste Präkanzerosen sind hierbei bestimmte Formen der Leukoplakien zu nennen [210]. Die rein klinische, deskriptive Diagnose einer Leukoplakie ist von der WHO als begrenzte, weißliche Fleckung der Mundschleimhaut definiert worden, die nicht wegwischt und keiner anderen Erkrankung zuzuordnen ist [210]. Die häufigste Form der Leukoplakien ist die homogene, plane oder einfache Leukoplakie, die jedoch insgesamt noch keine Präkanzerose im eigentlichen Sinn darstellt. Bei dieser Form besteht ein geschätztes Entartungsrisiko von 3-6% in 5-20 Jahren [83, 138]. Ohne daß dies für die rein klinische Einteilung der Leukoplakien Voraussetzung ist, ist hierbei histopathologisch neben einer Verlängerung und Verbreiterung der Epithelzapfen (Akanthose), einer zur Tiefe hin entzündlichen Infiltration des Stromas und einer Hyperkeratose und Dyskeratose, gelegentlich auch einer Parakeratose als Zeichen einer überstürzten Verhornung der oberen Zellen des Stratum spinosum nur beim Übergang in die präkanzeröse Form eine leichte bis mäßige Dysplasie erkennbar. Die inhomogene, präkanzeröse Leukoplakie in ihren Formen der verrukösen und nodulären Leukoplakie sowie der erosiven Leukoplakie oder Erythroleukoplakie ist histopathologisch häufig mit einer Dysplasie höheren Grades vergesellschaftet. Das Entartungsrisiko dieser Veränderungen liegt bereits bei 20-40%. Die Erythroplakie entspricht letztlich einem Carcinoma in situ und geht zu etwa 50% in ein invasiv wachsendes Karzinom über [83, 138].

Das histopathologische Korrelat zu den verschiedenen Stufen der Kanzerogenese bei den Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx ist häufig in Gewebsschnitten in verschiedenen Stadien nachweisbar (Abb. 26 und Abb. 31) [82, 179, 210]. So ist in dem zunächst intakten Plattenepithel der Schleimhaut bei der leichten oder geringen Dysplasie (Grad 1) neben einer Verbreiterung der Basalzellschicht (Basalzellenhyperplasie) bei intakter Schichtung der oberen Zellagen eine geringgradige Zell- und Kernpolymorphie zu beobachten. Eine mäßige oder mittelgradige Dysplasie (Grad 2) ist durch ein Übergreifen der vermehrten Basalzellen auf die mittlere Epithelschicht mit deutlicher Zell- und Kernpolymorphie und Mitosen, auch einzelnen atypischen Kernteilungsfiguren, in der basalen und mittleren Zellschicht charakterisiert. Bei der schweren oder hochgradigen Dysplasie (Grad 3) ist die Epithelschichtung fast völlig aufgehoben. Nur die oberflächliche Zellschicht ist noch etwas abgeflacht. Ausgeprägte Zell- und Kernpolymorphie sowie zahlreiche typische und atypische Mitosen sind im gesamten Epithel nachweisbar. Die Übergänge zum Carcinoma in situ, das sich vom eigentlichen Karzinom nur durch das fehlende invasive Wachstum bei intakter Basalmembran unterscheidet, sind hierbei fließend.

Der relativ hohe Anteil an kleineren Tumoren und die relativ geringe Metastasierungsrate im Bereich der ableitenden Lymphwege im erfaßten Patientenkollektiv sind darauf zurückzuführen, daß in dieser Studie nur Patienten berücksichtigt wurden, die primär chirurgisch und kurativ intendiert therapiert worden waren. Bei Patienten mit ausgedehnten Tumordinfiltrationen in benachbarte Strukturen und fortgeschrittenen Lymphknotenmetastasierungen wie auch Fernmetastasierungen ist der kurative Erfolg einer Operation nur mit wesentlichen Funktionseinschränkungen für den Patienten oder gar nicht zu erreichen, weshalb auf andere, oft palliative, Therapieformen ausgewichen wird. Der Einfluß der „klassischen“ Prognosefaktoren Tumorgröße (pT), Lymphknotenmetastasierung (pN) und Tumor-Grading (G) auf das Überleben und das Rezidiv-

freie Überleben der Patienten war in dem Patientenkollektiv dieser Studie signifikant (Abb. 16, Abb. 17 und Abb. 19). Trotzdem wären angesichts der noch immer unbefriedigenden Heilerfolge für die einzelnen Patienten zusätzliche Parameter zur Abschätzung des wahrscheinlichen Wachstumsverhaltens einer Neoplasie wünschenswert, welche die Grundlage für eine individuell angepaßte Therapie verbreitern würden. Daher ist eine intensive Suche nach neuen, objektiv quantifizierbaren Parametern notwendig.

5.2 Regulation von Zellzyklus und Apoptose

5.2.1 P53 und die assoziierten Parameter p90^{MDM2} und p21^{CIP}

Die zahlreichen durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen zum Nachweis von p53 bei verschiedenen Tumorentitäten gründen sich zum einen auf die Erkenntnis, daß das p53 bei der Regulation des Zellzyklus insbesondere bei im Genom geschädigten Zellen eine zentrale Rolle spielt, indem es für eine Unterbrechung des Zellzyklus sorgt, bis der genetische Schaden repariert ist oder die Apoptose der Zelle eingeleitet wird (Abb. 2), und zum andern auf die Annahme, daß das physiologisch in der Zelle vorhandene Wildtyp-p53 infolge einer sehr kurzen Halbwertszeit von etwa 20 Minuten im Zellzyklus nicht immunhistologisch nachweisbar, das mutierte und nicht funktionsfähige p53 mit seiner auf mehrere Stunden verlängerten Halbwertszeit durch Akkumulation im Zellkern jedoch immunhistologisch nachweisbar ist [11, 82, 154, 282]. Diese angenommene Korrelation zwischen Mutation mit Funktionsverlust und immunhistologischer Nachweisbarkeit kann jedoch durch einige Faktoren gestört werden [11, 87, 298].

Zu falsch negativen Ergebnissen kann es durch Artefakte bei der Fixierung des Tumorgewebes kommen, wenn das ursprünglich im Gewebe vorhandene Phosphoprotein p53 zum Beispiel durch Autolyse des Gewebes oder bakteriellen Abbau soweit verändert wurde, daß es durch den bei der Immunhistologie verwendeten Primärantikörper nicht mehr erkannt wird [298]. Eine Relevanz dieser Fehlerquelle ist bei den hier untersuchten, standardisiert gewonnenen Präparaten unwahrscheinlich, da an Stufenschnitten mehrere Parameter immunhistologisch untersucht wurden und in keinem Fall alle Ergebnisse negativ waren. So ist zumindest davon auszugehen, daß die Gewinnung und Vorbehandlung der Präparate generell zur Durchführung von immunhistologischen Untersuchungen geeignet war. Deletionen von Allelen des p53 haben bei immunhistologischen Methoden natürlich verminderte Ergebnisse zur Folge, wobei eine Deletion von beiden Allelen zu einem völligen Fehlen des p53 führt. Funktionell hat das aber die gleichen Auswirkungen wie ein durch Missense-Mutation funktionsunfähiges p53, das immunhistologisch nachweisbar sein sollte. Nonsense-Mutationen können ein soweit verkürztes, funktionsloses Phosphoprotein zur Folge haben, daß die vom Primärantikörper erkannte Determinante nicht mehr vorhanden ist. Außerdem haben Nonsense-Mutationen in der Regel keine Akkumulation des p53 zur Folge [82, 196, 298]. Weiterhin ist nicht sicher, daß jede Missense-Mutation, die zu einem funktionsunfähigen p53 führt, auch eine so große stabilisierende Funktion ausübt, daß die Halbwertszeit des veränderten p53 soweit verlängert wird, daß es sich im Zellkern anreichert [11].

Falsch positive Ergebnisse bei der immunhistologischen Färbung können dadurch zustande kommen, daß die Sensitivität der Methode soweit gesteigert wird, daß auch schon in physiologischen Mengen vorhandenes Wildtyp-p53 im Zellkern nachgewiesen wird [87]. Weiterhin kann es im Zellkern von Zellen zur Hochregulation von Wildtyp-p53 kommen, bei denen ein Schaden im Genom aufgetreten ist, was ja dem physiologischen Ablauf zur Reparatur des Genomschadens oder zur Einleitung der Apoptose entspricht [125]. Es kommt hierbei in erster Linie nicht zu einer erhöhten Produktion von p53, sondern ähnlich wie bei einer Punktmutation zu einer Verlängerung der Halbwertszeit von p53, hier allerdings durch Änderung des Phosphorylierungsgrades des Phosphoproteins.

Ein erhöhter Spiegel des zellulären Phosphoproteins p90^{MDM2} führt neben einer Bindung und funktionellen Inaktivierung auch zu einer wahrscheinlich sekundären Induktion des Wildtyp-p53 [82]. Ob das Wildtyp-p53 in der an das p90^{MDM2} gebundenen Form immunhistologisch nachweisbar ist oder nicht, hängt zum einen von der möglichen Maskierung der antigenen Determinante für den Primärantikörper des immunhistologischen Nachweissystems, zum anderen von der Halbwertszeit dieser Wildtyp-p53-p90^{MDM2}-Komplexe ab [87]. Aber auch Proteine aus Viren, wie das große T-Antigen des SV40-Papovavirus, das E1B-55-kD-Protein des Adenovirus, Typ 5 und das E6-Protein der humanen Papilloma-Viren 16 und 18 wie auch das EBNA-5 und das BZLF1-Protein des Epstein-Barr-Virus können durch Bindung an das Wildtyp-p53 eine Inaktivierung bewirken [230]. Eine Interaktion des großen T-Antigens und E1B-55-kD-Proteins führt dabei zu einer Stabilisierung des p53, womit ein immunhistologischer Nachweis möglich sein sollte, wenn die vom verwendeten Antikörper erkannte antigenen Determinante freigelegt werden kann [79, 230, 233]. Dagegen hat eine Bindung von E6-Protein der humanen Papilloma-Viren 16 und 18 neben der Inaktivierung einen raschen, Ubiquitin-abhängigen proteolytischen Abbau des p53 zur Folge, wobei es aber trotzdem noch immunhistologisch nachweisbar sein kann [224, 230]. In diesen Fällen ist vergleichbar zur Situation nach einer Missense-Mutation im

TP53-Gen der positive immunhistologische Nachweis von p53 mit einem Funktionsverlust dieses Tumorsuppressors verknüpft.

Für einen sicheren Nachweis von Mutationen im p53-Gen sind direkte Nachweismethoden im Genom, das heißt in der DNA erforderlich. Die immunhistologische Technik bietet allerdings die Vorteile, daß sie schnell auch bei größeren Fallzahlen durchführbar ist und die Ergebnisse direkt zu histomorphologischen Parametern innerhalb und außerhalb des Tumorgewebes korreliert werden können. In verschiedenen Tumorentitäten wie kolorektalen Karzinomen, primären Lungenkarzinomen und Harnblasenkarzinomen haben sich in vergleichenden Untersuchungen insgesamt gute Korrelationen zwischen Punktmutationen in den Exons des TP53-Locus und dem immunhistologischen Nachweis des p53-Phosphoproteins ergeben [11, 87]. Beim Leberzellkarzinom bei Kindern und beim Pankreas-Adenokarzinom konnte dagegen eine solche Korrelation nicht gefunden werden [11]. Weiterhin gibt es immunhistologische Untersuchungen, bei denen ein hoher Anteil an Cervixkarzinomen und Prostatakarzinomen immunhistologisch positiv für das p53-Phosphoprotein reagierte, in anderen Studien bei diesen Tumorentitäten aber nur in den wenigsten Fällen eine Mutation im TP53 nachgewiesen werden konnte [11]. Im Bereich der Karzinome der Mundhöhle, des Pharynx, Hypopharynx und des Larynx ergaben sich in vergleichenden Studien gute Korrelationen zwischen Mutationen im TP53 und dem immunhistologischen Nachweis von p53 im Tumorgewebe [2, 31, 33, 196]. In der vorliegenden Untersuchung wurde der immunhistologische Nachweis des p53-Phosphoproteins durch einen ebenfalls immunhistologischen Nachweis seines Regulator-Phosphoproteins p90^{MDM2} und seiner Effektor-Proteine p21^{CIP} und BAX an Serienschnitten ergänzt, wodurch ein Einblick in die Regulationsprozesse im Gewebe erreicht werden könnte (Abb. 5) [168, 254].

In etwa einem Drittel der Fälle, in denen das auf den Gewebsschnitten miterfaßte Epithel außerhalb des infiltrierend wachsenden Tumorgewebes keine erkennbaren Dysplasien aufwies, war ein immunhistologischer Nachweis von p53 in diesem Epithel möglich. Der Nachweis beschränkte sich dabei regelmäßig auf das Stratum basale, was darauf hindeutet, daß p53 in die Regulation der Zelldifferenzierung involviert ist [2, 31, 168, 169]. Das p90^{MDM2} und das p21^{CIP} waren erheblich öfter nachweisbar, wobei wiederum eine zonale Gliederung auffiel, indem diese Färbungen regelmäßig auf das Stratum spinosum und höhere Schichten begrenzt waren. Für das p21^{CIP} ist eine erhöhte Expression in weiter ausdifferenzierten Zellen allgemein bekannt, was zur alternativen Bezeichnung SDI1 (senescent cell derived inhibitor 1) geführt hat [60, 193]. Die selektive Expression von p90^{MDM2} im Stratum spinosum und höheren Schichten des Mundschleimhautepithels unterscheidet sich dagegen von der Situation in der äußeren Haut [48].

Da in diesen Epithelabschnitten der Mundschleimhaut mit nicht transformierten Zellen und nur sehr selten mit einer Mutation im TP53 zu rechnen ist, ist davon auszugehen, daß das nachgewiesene p53 durch exogene, genom-schädigende Noxen wie Tabakrauch insbesondere in Zusammenhang mit hochprozentigem Alkohol hochreguliert wurde und es sich um Wildtyp-p53 handelt [64, 65]. Sowohl die zonale Gliederung des Nachweises von p53 im Stratum basale und des nachfolgend exprimierten Effektormoleküls p21^{CIP} [60] sowie des ebenfalls vom p53 induzierten Antagonisten p90^{MDM2} in höheren Zellschichten ist durch physiologische Regulationsmechanismen erklärbar, wie auch der signifikant positive Zusammenhang zwischen der Expression von p53 und p90^{MDM2}, der sich aus der Induktion des p90^{MDM2} durch das p53 ergibt [181, 297]. Die fehlende Korrelation zwischen der Expression von p53 und p21^{CIP} im Epithel ohne Dysplasien könnte darauf zurückzuführen sein, daß p53 nur einer von mehreren induzierenden Faktoren des p21^{CIP} ist [59]. Unabhängig vom p53 ist eine Induktion des p21^{CIP} auch durch Zytokine über den PDGF-Rezeptor (platelet-derived growth factor receptor), den FGF-Rezeptor (fibroblast growth factor receptor) und den EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor) möglich [44, 175], deren Einfluß in dieser Studie nicht berücksichtigt wurde.

Im auf den Gewebsschnitten miterfaßten dysplastischen Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes war das p53 signifikant häufiger nachweisbar als im Epithel ohne Dysplasien, was sich aus einer häufigeren Genomschädigung in diesem Bereich gegenüber Epithel ohne Dysplasien ergibt [148]. Darüberhinaus war zwischen dem Dysplasiegrad und der p53 Expression hier ein signifikant positiver Zusammenhang nachweisbar [223, 239, 240, 295]. Wie im Epithel ohne Dysplasien war auch hier die zonale Gliederung des Nachweises von p53 im Stratum basale und von p90^{MDM2} sowie p21^{CIP} in höheren Zellschichten in ihrer Eigenschaft als vom p53 induzierten Molekülen erkennbar. Es ergab sich eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Nachweis von allen drei Parametern im dysplastischen Epithel, was ein Hinweis

darauf ist, daß in diesem Bereich nicht nur die Induktion von $p90^{MDM2}$ durch das p53 in physiologischen Bahnen verläuft, sondern auch die Induktion von $p21^{CIP}$ durch das p53 gegenüber anderen Regulationsmechanismen in den Vordergrund rückt.

Eine Korrelation zwischen dem Rauchen und dem Alkoholabusus mit der Expression von p53 [65, 145], $p90^{MDM2}$ und $p21^{CIP}$ im Epithel mit und ohne Dysplasien ergab sich in dieser Studie allerdings nicht, da in diese Studie nur Patienten mit einem invasiv wachsenden Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und des Oropharynx eingegangen waren. In diesem Kollektiv liegt der Anteil an Tabak- und Alkoholkonsumenten so hoch, daß eine statistische Signifikanz mangels Patienten ohne Nikotin- und Alkoholabusus nicht zu erwarten war.

Der Anteil der Tumoren, in denen p53 immunhistologisch nachweisbar war, entspricht mit etwa der Hälfte der Fälle dem anderer Untersuchungen von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx [9, 31, 145, 148, 168, 191, 211, 240, 285]. Auch bei den invasiv wachsenden Plattenepithelkarzinomen war die zonale Gliederung des Nachweises von p53 in der peripheren, am wenigsten ausdifferenzierten Zellschicht [31] und von $p90^{MDM2}$ sowie $p21^{CIP}$ bevorzugt in den zentral gelegenen, am weitesten ausdifferenzierten Zellen in umschriebenen Tumorearealen in den Fällen nachvollziehbar, in denen es zu einer partiellen Färbung der Tumorzellkerne kam und das Wachstumsmuster des Tumors die Abgrenzung von größeren umschriebenen Tumorearealen erlaubte. Zusätzlich war das $p90^{MDM2}$ in höher differenzierten Tumoren signifikant häufiger nachweisbar als in geringer differenzierten. Diese Befunde sprechen dafür, daß mitunter auch bei invasiv wachsenden Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx das physiologische Regulationsprinzip zwischen p53, $p90^{MDM2}$ und $p21^{CIP}$ noch vorhanden ist. Diese nur teilweise Färbung der Zellkerne war aber gerade im Falle des p53 selten. Dagegen kam es in jeweils annähernd der Hälfte der Fälle zu einer Anfärbung von praktisch allen Zellkernen des Tumorgewebes oder umgekehrt zu keinerlei Anfärbungen.

Nur für den immunhistologischen Nachweis von p53 und $p90^{MDM2}$ ergab sich eine signifikant positive Korrelation im Tumorgewebe [211]. Dabei ist zu berücksichtigen, daß zwar eine Induktion des $p90^{MDM2}$ durch eine Mutation des TP53-Gens beeinflusst wird, indem insbesondere bei Mutationen in den Exons 5 und 7 kein oder aber bei Mutationen im Exon 8 ein häufig allerdings verändertes $p90^{MDM2}$ induziert wird, die Interaktion zwischen den Phosphoproteinen p53 und $p90^{MDM2}$ durch eine Missense-Mutation in den „hotspots“ des TP53 jedoch nicht verhindert wird [7, 181]. Zwischen dem p53 und $p21^{CIP}$ ergab sich hier dagegen keine Korrelation. In diesem Fall ist am ehesten von einer Störung dieses Regulationsprinzips durch Funktionsverlust des p53 auszugehen, da eine Induktion des $p21^{CIP}$ durch p53 ein intaktes Wildtyp-p53 voraussetzt [214, 281]. Diese Regulationsstörung kann somit als Anhalt dafür gewertet werden, daß das immunhistologisch im Tumorgewebe nachgewiesene p53 größtenteils durch Inaktivierung und Akkumulation infolge einer Mutation des TP53-Gens oder Bindung des p53 durch zelluläre oder virale Proteine nachweisbar war.

In 12,9% der Fälle, in denen mehrere verschiedene Schnitte des Primärtumors miteinander verglichen werden konnten, ergaben sich für den Nachweis des p53 innerhalb des Primärtumors Differenzen als Zeichen einer intratumoralen Heterogenität. Für das $p90^{MDM2}$ und das $p21^{CIP}$ lag der Anteil dieser Fälle noch höher. Dieser Befund stützt die These einer teilweise multifokalen Kanzerogenese bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx [39, 188]. Allerdings ergaben sich auch Differenzen zwischen den Primärtumoren und den zugehörigen Lymphknotenmetastasen, was ein Zeichen für eine Änderung des Expressionsverhaltens von p53, $p90^{MDM2}$ und $p21^{CIP}$ während der Tumorprogression und Metastasierung sein kann. Es ist allerdings nicht sicher auszuschließen, daß hier ebenfalls primär verschiedene Tumorzellklone nachgewiesen wurden, die im Primärtumor bei dieser Untersuchung nur nicht vollständig erfaßt worden waren. Eine Korrelation zwischen der Expression von p53, $p90^{MDM2}$ und $p21^{CIP}$ in den Primärtumoren und auch der Änderung des Expressionsverhaltens in den Lymphknotenmetastasen gegenüber den Primärtumoren und der Lymphknotenmetastasierung (pN) oder der Tumorgroße (pT) ergab sich dabei nicht.

Die Resultate des p53-Nachweises lassen sich mit den Ergebnissen einer durchflußzytometrischen Untersuchung des DNA-Gehaltes von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und der Lippen vergleichen, die teilweise mit Hilfe einer bildanalytischen Zytometrie der Gewebsschnitte nach Feulgen-Färbung kontrolliert und ebenfalls an in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe vorgenommen wurde [6]. Eine Durchführung dieser immunhistologischen Untersuchungen bei dem identischen Patientengut zum direkten Vergleich mit den Ergebnissen der zytometrischen Untersuchungen war allerdings nicht möglich, da bei der durchflußzytometrischen Untersu-

chung so viel Tumorgewebe zur Messung verwendet werden mußte, daß hier überwiegend auf ein anderes Patientenkollektiv ausgewichen werden mußte. Hierbei ergab sich eine gute Übereinstimmung von dem Anteil der Tumoren, bei dem p53 immunhistologisch nachweisbar war, mit dem Anteil der aneuploiden Tumoren von 55% in der eigenen zytometrischen Untersuchung wie auch in einer anderen Untersuchung [293]. Wenn man davon ausgeht, daß das nachgewiesene p53 im Tumorgewebe mutiertem, funktionsunfähigem p53 entspricht, kommt es in diesen Fällen zu einem Ausfall des „Wächters des Genoms“: Schäden im Genom führen dann nicht mehr zu einer Unterbrechung des Zellzyklus mit Reparatur des Genomschadens oder Einleitung der Apoptose [143]. Damit können Schäden im Genom durch Zellproliferation weitergegeben werden, was zur Ausbildung von aneuploiden Zellklonen führen kann. Die Diskrepanz im DNA-Gehalt zwischen den Primärtumoren und deren Lymphknotenmetastasen in 17% der untersuchten Fälle als Zeichen einer intraindividuellen Heterogenität stimmt ebenso mit den Ergebnissen dieser immunhistologischen Untersuchungen weitgehend überein [6].

Im Gegensatz zur Tumorgroße und -infiltration (pT), zur Lymphknotenmetastasierung (pN), zum Tumor-Grading (G) und zur Stadieneinteilung ergab sich für den immunhistologischen Nachweis von p53, p90^{MDM2} und p21^{CIP} im Tumorgewebe in dieser Studie keine Korrelation zum Überleben und Rezidiv-freien Überleben der Patienten. Damit finden Ergebnisse von anderen Untersuchungen bei Plattenepithelkarzinomen aus dem Mundhöhlen-, Pharynx-, Hypopharynx- und Larynxbereich eine Bestätigung, bei denen das p53 allein immunhistologisch oder aber auch durch Sequenzierung des TP53-Gens untersucht wurde [2, 31, 71, 148, 205, 240, 293]. Bei verschiedenen anderen Tumoren des menschlichen Organismus wie dem Mammakarzinom, dem Kolonkarzinom, dem Magenkarzinom, dem Bronchialkarzinom, dem Harnblasenkarzinom, Lymphomen und Weichteilsarkomen ist der Einfluß des p53 auf die Prognose in zahlreichen Studien untersucht und belegt worden [100], was dafür spricht, daß bei diesen Tumorentitäten eine Veränderung der funktionellen Aktivität des p53 ein spätes Ereignis in der Kanzerogenese darstellt. Jeder Organtumor muß folglich bezüglich der molekulargenetischen Abläufe bei der Kanzerogenese und Tumorprogression einzeln betrachtet werden. Die Korrelation zwischen dem immunhistologischen Nachweis von p53 im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes und dem zugehörigen Dysplasiegrad des Epithels kann so interpretiert werden, daß Veränderungen in der Regulation des Zellzyklus durch das p53 bei der Kanzerogenese des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle und des Oropharynx ein frühes Ereignis darstellen [240]. Bei dieser Tumorentität hat die Expression von p53 somit in frühen Stadien der Kanzerogenese eine Bedeutung, nicht aber für die weitere Prognose bei Patienten mit einem invasiv wachsenden Plattenepithelkarzinom [2, 31, 148].

5.2.2 PRB und assoziierte Parameter

Während der Phosphorylierungsgrad des vom Retinoblastoma-Gen kodierten Phosphoproteins pRB vom Zellzyklus abhängig ist (Abb. 2) und von der Aktivität der CDK bestimmt wird (Abb. 5), ändert sich die Menge des pRB während des Zellzyklus physiologischerweise nicht [27, 36, 44, 88, 287]. Insoweit ist die fehlende Abhängigkeit des immunhistologischen pRB-Nachweises im Tumorgewebe von den Ergebnissen der immunhistologischen Bestimmungen von Cyclin D1, das die Aktivität der CDK induziert [44, 66, 92], p16^{INK4a} und p21^{CIP}, die die Aktivität der CDK blockieren [90, 122, 231, 301, 306], ebenso wie die fehlende zonale Gliederung der pRB-Expression im Epithel und Tumorgewebe nicht ungewöhnlich. Auch ein Zusammenhang mit der p53-Expression war über diese Regulationskaskade nicht zu erwarten, zumal im Tumorgewebe die p21^{CIP}-Expression nicht vom immunhistologischen Nachweis von p53 abhängig war. Die positive Korrelation zwischen den Ergebnissen der immunhistologischen Bestimmungen von p53 und pRB im Tumorgewebe ist eher auf gemeinsame oder zumindest miteinander in Beziehung stehende Antagonisten zurückzuführen. So bindet und inaktiviert das zelluläre Protein p90^{MDM2} sowohl p53 als auch pRB (Abb. 85) [299]. Einige onkogene Viren führen zur Freisetzung von Proteinen, die mit beiden Tumorsuppressorgen-Produkten interagieren: Die humanen Papilloma-Viren 16 und 18 bewirken nicht nur eine Produktion des E6-Proteins [177, 288], das an die C-terminale Domäne des p53 bindet und eine Ubiquitin-abhängige Degradation des Moleküls induziert [224], sondern auch des E7-Protein, welches an pRB bindet und es inaktiviert [57, 104]. Das E1B-55-kD-Protein des Adenovirus, Typ 5 hat spezifische Bindungsstellen im p53-Phosphoprotein [222] und das E1A-Protein desselben Virus im pRB [290]. Das große T-Antigen des SV40-Papovavirus kann mit seinen Aminosäuren 400-650 an p53 [144, 222] und mit seinen Aminosäuren 105-114 an pRB [49] binden. Zumindest aus der Gruppe der onkogenen DNA-Viren scheinen somit vor allem diejenigen transformierend zu wirken, die die Produkte von beiden Tumorsuppressorgen binden und inaktivieren können. Ein alleiniger Verlust der tumorsuppri-

mierenden Wirkung von pRB könnte durch eine erhöhte p53-abhängige Apoptose kompensiert werden [44, 62, 182]. So ergab sich auch bei den hier untersuchten Tumoren ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen dem immunhistologischen Nachweis des Zellzyklus-Promotors Cyclin D1, der eine Hyperphosphorylierung des pRB und damit eine Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F bewirkt, und sowohl einer erhöhten p53-abhängigen Apoptoserate als auch der Expression des Apoptoseförderers BAX.

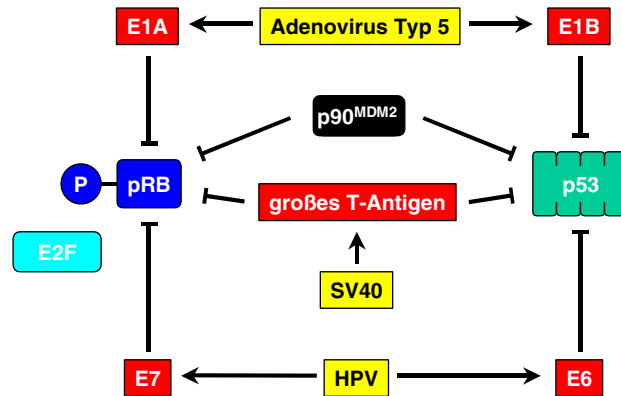


Abb. 85: Das zelluläre Phosphoprotein p90^{MDM2} und die viralen Proteine E1A und E1B des Adenovirus, Typ 5, großes T-Antigen des SV40-Papovavirus und E6 und E7 der humanen Papilloma-Viren 16 und 18 (HPV) können das p53 und/oder das pRB binden und inaktivieren. Die Fähigkeit des pRB, die transaktivierende Funktion des E2F zu blockieren, geht dabei verloren.

Eine weitere Beschränkung des Wertes des immunhistologischen Nachweises von pRB neben der Unabhängigkeit der Ergebnisse vom Zellzyklus ist das Fehlen von charakteristischen Mutationen im Retinoblastoma-Gen, die analog zu den typischen Punktmutationen im TP53-Gen zu einer Expressionsänderung von pRB führen. Es wurden bei verschiedenen Tumorentitäten zwar Mutationen im Bereich der sogenannten pRB-Tasche gefunden, ansonsten sind aber Deletionen und Punktmutationen relativ gleichmäßig über das gegenüber dem TP53-Gen komplexere Retinoblastoma-Gen verteilt [44]. Ein Einfluß auf die immunhistologischen Ergebnisse ist hierbei nur im Falle von Deletionen im Retinoblastoma-Gen oder von Mutationen oder einer Hypermethylierung in der Promotorregion zu erwarten [24, 158].

Insgesamt stellen Veränderungen dieses Tumorsuppressorgens bei verschiedenen Tumorentitäten frühe Ereignisse in der Kanzerogenese dar [16]. Letztlich hatte auch in dieser Untersuchung der immunhistologische Nachweis von pRB im Tumorgewebe keine prognostische Bedeutung für das Überleben oder Rezidiv-freie Überleben von Patienten mit einem manifesten Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und des Oropharynx. Es ergaben sich lediglich positive Korrelationen zur Tumorgroße und -infiltration pT und zur Proliferationsaktivität im Tumorgewebe, wobei allerdings aus der immunhistologischen Untersuchung nicht zu ermitteln war, ob das nachgewiesene pRB in der Lage ist, den Transkriptionsfaktor E2F zu binden, oder infolge einer Hyperphosphorylierung oder einer Konformationsänderung durch Missense-Mutation im Retinoblastoma-Gen seine tumorsupprimierende Wirkung verloren hat.

Der immunhistologische Nachweis von p16^{INK4a} im Epithel zeigte parallel zu dem des p21^{CIP} eine Aussparung des Stratum basale, obwohl beide Proteine unterschiedlichen Familien von Inhibitoren von Cyclin-abhängigen-Kinasen angehören [90, 122, 231, 301, 306]. Die Inhibitoren der CIP-Familie (CDK interacting protein), in die p21^{CIP} einzuordnen ist, und der INK4-Familie (polypeptid inhibitor of CDK4 and CDK 6), der p16^{INK4a} angehört, zeigen zueinander keine strukturelle Ähnlichkeit. Die Mitglieder der INK4-Familie sind nur in der Lage die CDK4 und CDK6 zu inhibieren, während im Gegensatz dazu die CIP-Familie auch die CDK2 im Komplex mit den entsprechenden Cyclinen hemmen kann. P21^{CIP} entfaltet seine Wirkung in vivo allerdings wie p16^{INK4a} hauptsächlich in der G₁-Phase des Zellzyklus, obwohl es durch Bindung an Cyclin, CDK und PCNA (proliferating cell nuclear antigen), eine Untereinheit der DNA-Polymerase δ , auch in der Lage wäre, die DNA-Synthese in der S-Phase zu hemmen [30, 90, 301, 306].

Im Tumorgewebe war dagegen diese zonale Gliederung der immunhistologischen Färbung für p16^{INK4a} nicht nachvollziehbar. Auch zwischen den Ergebnissen der immunhistologischen Bestimmungen von beiden CDK-Inhibitoren war eine Korrelation nicht erkennbar. Neben einer nur tendenziellen Abhängigkeit des p16^{INK4a}-Nachweises vom Tumor-Grading, bei der p16^{INK4a} in höher differenzierten Tumoren gegenüber gering differenzierten Tumoren vermehrt nachweisbar war, ergab sich kein Zusammenhang mit der Tumorgroße und -infiltration, der Lymphknotenmetastasierung und dem Tumorstadium. Ebenso war ein Einfluß auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten nicht feststellbar.

Die Expression von Cyclin D1 war im Mundschleimhautepithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumorgewebes streng auf suprabasal gelegene Zellkerne beschränkt. Sowohl im Stratum basale als auch in den über dem Stratum spinosum liegenden Gewebsschichten war regelmäßig keine immunhistologische Färbung erkennbar. Auch im Tumorgewebe war diese regionale Verteilung der Cyclin D1-Expression bei nur partieller Färbung der Zellkerne innerhalb umschriebener Tumorbezirke nachvollziehbar, indem die zentral gelegenen Zellen meistens negativ waren. Eine Aussparung der Färbung in der äußeren Zellage der Tumoreareale analog zum Stratum basale im Epithel war hier allerdings nicht zu finden. Die Expression des Cyclin D1 zeigt durch die topographische Begrenzung der immunhistologischen Färbungen somit eine Abhängigkeit von der Zelldifferenzierung. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen im Epithel und im Tumorgewebe weisen auf eine geänderte Regulation der Zelldifferenzierung im Tumorgewebe gegenüber der physiologischen Situation im Epithel hin.

Auffällig war weiterhin ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen dem immunhistologischen Nachweis von p21^{CIP} und Cyclin D1 im Tumorgewebe, der sich dadurch erklären läßt, daß durch das p21^{CIP} Cyclin-CDK-Komplexe inhibiert werden [90, 301, 306]. Die Progression der Zellen durch den Zellzyklus wird aber durch diese Komplexe reguliert. Infolge einer Hemmung der Cyclin D1-CDK-Komplexe durch p21^{CIP} könnte es zu einem prolongierten Verbleib der Zellen in der G₁-Phase und als Gegenregulation zu einer Überexpression von Cyclin D1 mit dem Ziel kommen, doch in die nachfolgenden Phasen des Zellzyklus eintreten zu können. Der Zusammenhang zwischen einer positiven Cyclin D1-Expression im Tumorgewebe und der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen unterstreicht die Bedeutung der Regulation des Zellzyklus und damit der Proliferation für die Progression der Tumorerkrankung. Ein signifikanter Einfluß des Cyclin D1-Nachweises auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben war dabei allerdings nicht feststellbar.

5.2.3 Proliferation und Apoptose

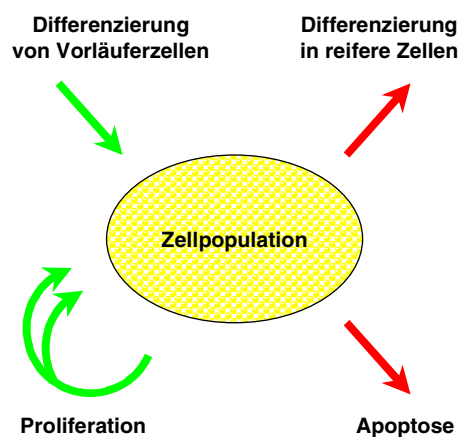


Abb. 86: Regulation der Zellzahl durch Proliferation, Differenzierung und Apoptose.

Proliferation und Apoptose beeinflussen die Zellzahl in einem Gewebsverband in entgegengesetzter Richtung (Abb. 86) [130, 215]. Die endgültige Zellzahl hängt neben Differenzierungsvorgängen letztlich vom Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose oder aber von einer Störung desselben ab [66]. Die Homöostase kann nur dann aufrecht erhalten werden, wenn die durch äußere und innere Faktoren regulierten Signalwege genau aufeinander abgestimmt sind. In diesem Patientenkollektiv war die große Bedeutung der Proliferation für die Progression der Tumorerkrankung dadurch erkennbar, daß die durch den immunhistologischen Nachweis von Ki-67 bestimmte Proliferationsaktivität sowohl einen signifikant positiven Einfluß auf die Tumor-

größe und -infiltration pT als auch auf die Lymphknotenmetastasierung pN und damit auch auf das Tumorstadium hatte. Es war zwar kein statistisch signifikanter Einfluß auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten nachweisbar, Patienten mit einer geringen Proliferationsaktivität im Tumorgewebe hatten aber eine tendenziell bessere Überlebenszeit und Rezidiv-freie Überlebenszeit als die übrigen Patienten. Patienten mit einer besonders hohen Proliferationsaktivität zeigten umgekehrt einen tendenziell ungünstigeren Verlauf [300].

Bei der Bestimmung des Ki-67-Indexes fiel aber nicht nur eine starke intertumorale sondern auch eine erhebliche intratumorale Streuung der Ergebnisse auf. Tumoren haben in der Regel einen klonalen Ursprung, das heißt sie entstehen aus einer einzelnen normalen Zelle [194]. Die Entwicklung eines Tumors vollzieht sich nachfolgend in diskreten Schritten (Abb. 8). Durch Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die in diesen Signalwegen liegen, kann die Balance zwischen den verschiedenen Regulationsmechanismen nachhaltig gestört werden. In dieser Situation ist nicht selten ein Überwiegen der Apoptose die Folge. Die Chance, daß durch Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen ein neues Gleichgewicht geschaffen wird, in welchem die Proliferation dominiert, ist relativ gering. Dies ist möglicherweise einer der Gründe dafür, daß die maligne Transformation von einer von etwa 10^{17} Zellen des menschlichen Organismus nur einmal in der Lebenszeit von drei Menschen eintritt [62]. Im Rahmen der malignen Transformation erhält eine einzelne Zelle durch ein initiales Ereignis einen Wachstumsvorteil gegenüber den benachbarten Zellen (Abb. 87) [194]. Dies führt dazu, daß die Einzelzelle zu einem Klon identischer Zellen expandieren kann. Nachfolgend kann eine Zelle dieses Klons von einem weiteren Ereignis getroffen werden, aus dem sich wiederum ein Wachstumsvorteil ergibt. Diese Sequenz wiederholt sich so lange, bis eine Zelle schließlich zu einem Tumor auswächst, der den Kontrollmechanismen des Wirts weitgehend entzogen ist. Der Tumor bricht in benachbartes Gewebe ein (Invasion) und siedelt schließlich Tochtergeschwülste in entfernt liegendem Gewebe ab (Metastasierung). Obwohl letztlich ein Zellklon den größten Wachstumsvorteil mit der Folge einer Verdrängung anderer Klone erlangen dürfte, ist zumindest temporär die Koexistenz verschiedener Klone denkbar. Die Differenzen beim Ki-67-Nachweis und der übrigen hier bestimmten Parameter innerhalb der einzelnen Tumoren, insbesondere aber auch der hohe Anteil von dysplastischem Epithel außerhalb des infiltrierend wachsenden Tumorgewebes, der auf den vorhandenen Schnitten mit-erfaßt wurde, stützen allerdings die Annahme einer multifokalen Kanzerogenese oder Feldkanzerisierung bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx [39, 188]. Unterschiede in der Proliferationsaktivität von Tumoren sind dabei aber sicherlich nicht nur von inneren Ursachen, sondern auch von äußeren Bedingungen, wie zum Beispiel einer genügenden Substratzufuhr abhängig.

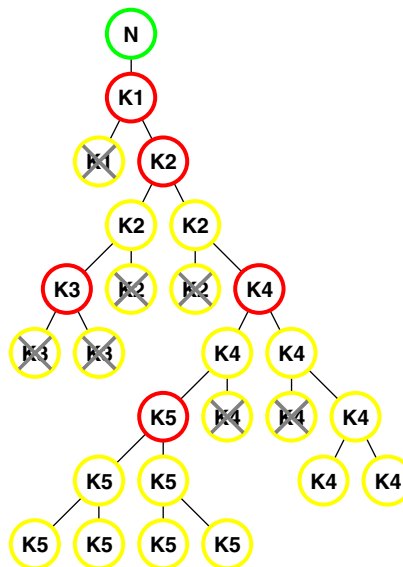


Abb. 87: Modell der malignen Evolution maligner Tumoren: Aus einer normalen Zelle (N) entsteht ein Zellklon mit einem Wachstumsvorteil (K1). Durch weitere Ereignisse entstehen weitere Klone (K2-5) mit weiteren Wachstumsvorteilen. Nicht alle Klone sind überlebensfähig, einige werden durch Kontrollmechanismen des Wirts eliminiert.

Ein direkter Zusammenhang zwischen Proliferation und Apoptose war generell in den Tumoren nicht nachweisbar. Aber große und die Nachbarstrukturen infiltrierende Karzinome zeigten neben einer verstärkten Proliferation auch eine erhöhte Apoptoserate. Zur Bestimmung des Apoptose-Index wurde eine Enzym-verbundene Nachweismethode von DNA-Fragmenten mit terminaler Transferase verwendet, die schon in früheren Untersuchungen eingesetzt worden war [3, 5, 72, 134, 253, 300]. Die Apoptoserate war verglichen mit anderen Tumorentitäten eher gering [5], aber vergleichbar mit früheren Untersuchungen bei oralen Plattenepithelkarzinomen [22, 134, 300]. Zusätzlich wurden hier allerdings auch morphologische Aspekte berücksichtigt, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen [111, 131]. Beim Vergleich der so gewonnenen Apoptose-Indices mit den immunhistologisch bestimmten Ki-67-Indices fällt eine größenordnungsmäßige Diskrepanz auf. Dabei ist zu berücksichtigen, daß bereits ein Apoptose-Index von 2-3% einem Gewebsverlust von 25% pro Tag entsprechen kann [131]. Dagegen bedeutet die Expression von Ki-67 lediglich, daß sich die Zellen nicht in der G₀- oder G_T-Phase, sondern in der G₁-, S- oder G₂-Phase des Zellzyklus befinden, der sich über einen sehr langen Zeitraum erstrecken kann, bevor die Zellen in die eigentliche Zellteilung (Mitose) eintreten [44].

Die Regulation der Apoptose ist komplex und wird von verschiedenen positiven und negativen Signalen bestimmt [252]. In Zellen, die einen subletalen Schaden innerhalb ihres Genoms tragen, ist der Eintritt in die Apoptose zunächst von der Funktion des Tumorsuppressors p53 abhängig [44, 143]. Im untersuchten Tumorkollektiv war p53 in etwa der Hälfte der Fälle im Tumorgewebe immunhistologisch nachweisbar. Diese positive Expression war mit einer geringen oder nicht nachweisbaren Apoptoserate verknüpft. Wenn man davon ausgeht, daß in diesen Fällen das p53 vorwiegend infolge einer Stabilisierung des Phosphoproteins wahrscheinlich durch eine Missense-Mutation im TP53-Gen in den Zellkernen akkumulierte, folgt daraus, daß die Funktion von p53, die Apoptose zu induzieren, in etwa dieser Hälfte der untersuchten Tumoren verlorengegangen ist [134]. Zusätzlich gestützt wird diese Annahme durch die nachgewiesene negative Korrelation zwischen den immunhistologischen Bestimmungsergebnissen von p53 und dem davon induzierten Apoptoseförderer BAX [180]. Auch hier ist nämlich ein positiver p53-Nachweis im Tumorgewebe mit einem Funktionsausfall, und zwar dem Verlust der Fähigkeit, die Expression von BAX zu induzieren, verknüpft. Diese Verbindung war bei einer Analyse der Interaktionen zwischen p53 und p21^{CIP} im Tumorgewebe nicht nachweisbar, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß an der Regulation der p21^{CIP}-Expression noch zahlreiche andere Faktoren als p53 beteiligt sind [44, 175].

BAX erwies sich auch in dieser Untersuchung als potenter Förderer der Apoptose [300]. Umgekehrt war bei einem positiven immunhistologischen BCL-2-Nachweis eine signifikante Hemmung der Apoptose nachweisbar. Zusätzlich bestand eine reziproke Korrelation zwischen diesen beiden antagonistisch wirkenden Regulatoren der Apoptose [1, 119, 200]. BCL-2 ist als Onkogen bekannt, das Zellen vor einer p53-induzierten Apoptose bewahren kann und in vielen Tumorentitäten verstärkt nachgewiesen werden konnte [5, 35, 53, 142, 147, 207, 209]. Der Mechanismus der Hochregulation in Tumoren ohne die 14;18-Translokation des BCL-2-Gens ist noch weitgehend unbekannt [206]. Es könnte eine Störung der posttranslatorischen Regulation von BCL-2 bei Plattenepithelkarzinomen geben [1]. BCL-2 war nicht nur hauptsächlich in den äußeren, weniger ausgereiften Zellen der Plattenepithelkarzinome nachweisbar, sondern auch vermehrt in weniger gut differenzierten Tumoren [56, 243]. Diese Prädisposition des positiven BCL-2-Nachweises für geringer ausdifferenzierte Zellen ist bekannt und entspricht offensichtlich der natürlichen Funktion des BCL-2, Keimgewebe vor dem Untergang durch Apoptose zu bewahren [35, 98]. Im Gegensatz zum konventionellen Tumor-Staging und -Grading erwies sich aber keiner der hier zusätzlich bestimmten Parameter als geeignet, das Überleben oder Rezidiv-freie Überleben der Patienten mit einem invasiv wachsenden Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und des Oropharynx vorherzusagen, wenn sich auch eine vermehrte BAX-Expression im Tumorgewebe tendenziell als negativer Prognosefaktor herausstellte [300].

5.3 Adhäsionsmoleküle

5.3.1 E-Cadherin

Die große Bedeutung von E-Cadherin als Adhäsionsmolekül, das interzelluläre Bindungen vermittelt, ist durch zahlreiche Beobachtungen aufgedeckt worden [118]: Zellen, die kein E-Cadherin exprimieren, zeigen keine Aggregation oder Adhäsion untereinander; umgekehrt führt eine Expression von E-Cadherin auf den Zellmembranen zur Fähigkeit der interzellulären Adhäsion [23]. E-Cadherin ist physiologischerweise vor allem auf den Zellmembranen zu finden und hier hauptsächlich im Bereich von interzellulären Bindungsstellen [86]. Bei Zellen, die E-Cadherin exprimieren, kann die Fähigkeit zur Aggregation durch monoklonale Antikörper gegen E-Cadherin neutralisiert werden [112]. Auch eine Deletion der E-Cadherin-kodierenden Gene oder hier lokalisierte Mutationen führen zu diesem Ergebnis [86]. Eine Ca^{++} -freie Umgebung bewirkt eine Dissoziation der Zellen. Und letztlich können E-Cadherin-negative Zellen durch Transfektion mit E-Cadherin-cDNA ihre Fähigkeit zur Aggregation wiedererlangen [94].

Im gesamten auf den untersuchten Tumorpräparaten miterfaßten Epithel zeigte sich mit Ausnahme des Stratum basale eine kräftige membranöse Färbung beim immunhistologischen Nachweis von E-Cadherin. Während in den Keimzellen des Epithels somit kein E-Cadherin nachweisbar war, exprimierten die ausgereiften Zellen der höheren Schichten dieses regelmäßig. Im Tumorgewebe war dagegen diese Färbung keineswegs immer auf die Zellmembranen begrenzt, sondern teilweise auch im Zytoplasma zu finden. Dabei überwog in einigen Fällen sogar die zytoplasmatische Färbungsintensität die membranöse. Daneben gab es einen Anteil an Tumoren ohne erkennbare Färbung beim immunhistologischen Nachweis von E-Cadherin; die Patienten, die an diesen Tumoren erkrankt waren, zeigten tendenziell ein schlechteres Überleben und Rezidiv-freies Überleben als die übrigen Patienten. Ansonsten hatte bei positiver Färbung das Färbungsmuster keine prognostische Bedeutung.

Eine Fehlfunktion im Bereich der E-Cadherin-vermittelten interzellulären Bindungen kann im Tumorgewebe durch verschiedene Pathomechanismen verursacht werden: Eine Herunterregulation der E-Cadherin-Expression kann durch Hypermethylierung der Promotorregion (5'CpG-Insel) des E-Cadherin-Gens erfolgen [78]. In Tumoren wird häufig eine Heterogenität der verminderten Expression des E-Cadherin beschrieben. Hierfür kann zum einen eine echte zelluläre Heterogenität verantwortlich sein, zum anderen auch eine instabile E-Cadherin-Expression der Tumorzellen, die zum Teil auch von Milieubedingungen abhängen kann [93, 165]. Überdies kann ein vermehrter proteolytischer Abbau des E-Cadherin-Moleküls zu einer verminderten Expression in Tumorzellen führen [126]. Bei den beschriebenen genetischen Aberrationen handelt es sich entweder um Allelverluste (loss of heterozygosity) [166] und/oder um echte Genmutationen wie Punktmutationen, die in diffusen Magenkarzinomen [12, 13, 14] und invasiv-lobulären Mammakarzinomen nachgewiesen werden konnten [18, 123]. Durch Vermittlung von α -Catenin und β -Catenin koppeln die E-Cadherin-Moleküle an das Zytoskelett [118]. Das α -Catenin zeigt eine signifikante Homologie zu Vinculin, das in den Zonulae adhaerentes und im Bereich von fokalen Zellkontakten lokalisiert ist [184, 277]. Das β -Catenin zeigt Homologien zu Plakoglobin (γ -Catenin), einem wichtigen Bestandteil der Desmosomen und Zonulae adhaerentes [262]. In Tumoren kann die Störung der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion auch durch eine reduzierte α - und β -Catenin-Expression bedingt sein, was möglicherweise die Invasivität und metastatische Potenz der Tumorzellen beeinflusst [120, 167, 261, 262]. Überdies können biochemische Modifikationen wie eine Tyrosin-Phosphorylierung von β -Catenin die Funktion des Cadherin-vermittelten Zelladhäsionssystems modulieren oder supprimieren. Dabei kann die Tyrosin-Phosphorylierung durch Onkogene, wie das v-SRC (Onkogen des Rous-Sarkom-Virus) und v-FOS (Onkogen des murinen FBJ-Osteosarkom-Virus), sowie durch Wachstumsfaktoren, wie EGF (epidermal growth factor) und HGF (hepatocyte growth factor), vermittelt werden [95, 241]. Mutationen der α - und β -Catenin-Gene wurden jedoch bisher nur in Karzinomzelllinien beobachtet, aber nicht in vivo [34]. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Produkt des Gens der adenomatösen Polyposis coli (APC) Bindungen mit α - und β -Catenin eingeht [220, 259]. E-Cadherin und APC kompetieren direkt um Bindungen mit dem β -Catenin [110]. Die N-terminale Domäne des β -Catenins vermittelt dabei die Ankoppelung der E-Cadherin- β -Catenin- und APC- β -Catenin-Komplexe an das Zytoskelett über eine Bindung an das α -Catenin. Plakoglobin, das ja strukturell mit dem β -Catenin verwandt ist, vermittelt ähnliche Interaktionen. Bei Krebspatienten wurde eine deutlich erhöhte Urinausscheidung von löslichem E-Cadherin gefunden, was auf eine vermehrte Ablösung des Moleküls von der Zelloberfläche zurückgeführt wurde [126, 127]. Alterierte immunhistologische Verteilungsmuster mit zytoplasmatischer Anfärbung werden mit

einer abnormalen (Um-)Verteilung von Cadherin- und/oder Catenin-Molekülen in Verbindung gebracht [115]. Auch physiologischerweise existiert ein intrazellulärer Pool von freiem E-Cadherin und E-Cadherin-Catenin-Komplexen. Zwischen membranständigem E-Cadherin und diesem Pool ist ein ständiger Austausch möglich [118].

Von diesen möglichen Mechanismen, die zu einer Änderung der Funktionsfähigkeit von E-Cadherin in Tumorzellen führen können, scheint der komplette Verlust der Expression von E-Cadherin im untersuchten Tumorkollektiv die größte Bedeutung zu haben, da er zumindest tendenziell einen Einfluß auf die Prognose der Patienten ausübt. Mutationen im E-Cadherin, die zu einem Funktionsverlust, aber nicht zu einer fehlenden Expression führen, lassen sich ebenso wie Fälle, in denen es zu Fehlfunktionen im Bereich der Catenine kommt, mit Hilfe dieser immunhistologischen Untersuchungen nicht abgrenzen. Lediglich eine Umverteilung der Expression zwischen Zellmembran und Zytoplasma war zu beobachten, die aber prognostisch nicht relevant war.

5.3.2 CD44

Durch die Ergebnisse zahlreicher Studien konnte nachgewiesen werden, daß die CD44-Expression und insbesondere die Expression von bestimmten varianten CD44-Isoformen einen Einfluß auf die Prognose und Metastasierungspotenz verschiedener Tumorentitäten ausübt. Dabei sind die Resultate dieser Studien zum Teil widersprüchlich. Grundsätzlich lassen sich drei Gruppen von Tumoren unterscheiden: Die erste Gruppe umfaßt Tumoren, bei denen die Expression bestimmter Isoformen überwiegend mit einer ungünstigeren Prognose korreliert, wie das Magenkarzinom [170, 258, 286], Kolorektalkarzinom [302], Mammakarzinom [47, 128], Plattenepithelkarzinome der Cervix uteri [121] und Vulva [266] und maligne Lymphome [58, 250]. Meistens ist hier die Neuexpression von Isoformen für die Prognoseverschlechterung entscheidend, die das variante Exon V6 enthalten. In der zweiten Gruppe sind Tumoren enthalten, bei denen die CD44-Expression keine erkennbare Bedeutung für den Krankheitsverlauf hat, wie das Ovarialkarzinom [244] und Bronchialkarzinom [75], oder die Daten widersprüchlich oder noch unzureichend sind, wie das Nierenzellkarzinom [269] und das maligne Melanom [21, 135]. In der dritten Gruppe können Tumorentitäten zusammengefaßt werden, bei denen die Expression von CD44s oder bestimmter Isoformen meistens mit einer günstigeren Prognose korreliert, wie das Neuroblastom [41, 267] und Plattenepithelkarzinome der Haut [229]. Bei laryngealen Plattenepithelkarzinomen im Tumorstadium IV [245] war eine Verminderung der CD44v6-Expression im Tumorgewebe mit einem kürzeren Überleben der Patienten korreliert [247]. In weiteren Untersuchungen war die CD44v6-Expression bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle in den Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu den zugehörigen Primärtumoren vermindert [141] und in geringer differenzierten Tumoren gegenüber höher differenzierten Tumoren ebenfalls reduziert [246].

Über die molekularen Mechanismen, mit denen sich Tumorzellen durch Änderung der Expression von bestimmten CD44-Spleißvarianten einen Wachstumsvorteil oder die Fähigkeit zur Metastasierung verschaffen, wird zur Zeit noch spekuliert. Klar gezeigt werden konnte, daß die Metastasierung bestimmter Tumorzelltypen durch monoklonale Antikörper gegen CD44-Varianten supprimiert werden kann [228]. In vitro inhibieren Antikörper gegen CD44 überdies direkt die Endothelproliferation und -migration sowie auch den stimulierenden Effekt von Hyaluronsäure-Polysacchariden auf die Endothelproliferation und -migration [273]. Adhäsionsmoleküle wie das CD44 können sowohl positive als auch negative Einflüsse auf die Progression von malignen Tumoren ausüben [86, 102, 305]. Einerseits, wie im Falle des E-Cadherins, verhindern sie die Ablösung von potentiell metastasierenden Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors, indem sie den Zell-Zell-Kontakt erhalten. Andererseits ermöglichen sie die Bindung von extra- oder intravasalen, aus dem Zellverband des Primärtumors herausgelösten Zellen an Endothelien und fördern damit die hämatogene und lymphogene Metastasierung (Abb. 9) [102]. Zusätzlich sind Adhäsionsmoleküle in die Bildung von homophilen und heterophilen Zellaggregaten involviert, die zu einer Metastasierung durch passive Embolisation von Kapillaren in entfernten Organen beitragen können. Durch Aggregatbildung ist außerdem die Chance, der immunologischen Überwachung des Wirtsorganismus zu entgehen, größer. Letztlich beeinflussen Adhäsionsmoleküle auch eine aktive Bindung von metastasierenden Zellen an Strukturen der Zielorgane. Damit sind Änderungen in der Expression und Funktion von Zelladhäsionsmolekülen zwar nicht allein zur malignen Transformation von Zellen ausreichend, für den Prozeß der Tumورprogression allerdings essentiell [186].

Erst die Kenntnis der CD44-Isoformen, die physiologischerweise auf bestimmten Zellen in verschiedenen Differenzierungs- und Aktivierungsphasen exprimiert werden, vermag einen Einblick in die verschiedenen Funktionen des CD44 zu vermitteln. Daher ist insbesondere der Vergleich von CD44-Isoformen, die auf Tumorzellen exprimiert werden, mit denen, die physiologischerweise auf dem nicht transformierten Gewebe exprimiert werden, aus dem sich der jeweilige Tumor entwickelt hat, für diagnostische und prognostische Zwecke entscheidend [229]. Durch monoklonale Antikörper, die spezifisch für Proteinabschnitte sind, die von einzelnen varianten Exons kodiert werden, konnten Isoformen identifiziert werden, die physiologischerweise im Epithelgewebe exprimiert werden. Diese schließen neben der Standardform CD44s die sogenannte epitheliale Form CD44v8-v10 und die Keratinozytenform CD44v3-v10 ein [310]. Auch im Epithel der Mundhöhle und des Oropharynx waren in dieser Studie die Produkte der varianten Exons V4, V5, V6, V7 und V9 in allen Fällen nachweisbar. Die membranöse Färbung war dabei in allen Zellagen des Epithels mit Ausnahme der obersten Schicht erkennbar [26, 96, 108, 140, 199]. Die verschiedenen exprimierten CD44-Isoformen könnten somit im normalen Plattenepithel wichtig für die Adhäsion der Zellen untereinander, aber auch zur extrazellulären Matrix sein [108, 176]. Darum ist wahrscheinlich eher die Herunterregulation oder sogar der Verlust der Expression von diesen Isoformen als pathologische Veränderung auf Tumorzellen in Plattenepithelkarzinomen anzusehen, die von diesem Gewebe ausgehen [96, 221, 229].

In etwa 60% der Fälle waren in dieser Studie alle untersuchten CD44-Spleiß-Varianten neben dem Epithel der Mundschleimhaut und des Oropharynx auch in den Plattenepithelkarzinomen nachweisbar, womit also keine Änderung des Expressionsverhaltens im Verlauf der Kanzerogenese feststellbar war. In etwa 40% der Fälle war allerdings die Expression von mindestens einer untersuchten Isoform vermindert. Eine verminderte Expression der varianten Exons V4, V5 und V6 wurde nur in einzelnen Fällen gefunden, so daß bei alleiniger Betrachtung eine signifikante Korrelation zu anderen hier berücksichtigten Parametern nicht zu erwarten war. Der immunhistologische Nachweis von CD44v7 und CD44v9 ergab dagegen wesentlich häufiger veränderte Resultate. Für beide Isoformen konnte ein signifikant negativer Einfluß der Expressionsminderung auf das Überleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier nachgewiesen werden. Insbesondere aber die gemeinsame Auswertung der Expression aller hier untersuchten CD44-Isoformen auf die Prognose ergab nicht nur in der univariaten, sondern auch in der multivariaten Analyse mit Hilfe des Cox-Modells einen signifikant negativen Einfluß auf die Überlebenszeit und Rezidiv-freie Überlebenszeit der betroffenen Patienten, wenn eine der untersuchten Isoformen im Tumorgewebe im Vergleich zum Epithel vermindert exprimiert wurde [255]. Dagegen ist bei anderen Tumoren die verstärkte oder neu erworbene Expression verschiedener varianter CD44-Formen als pathognomonisch anzusehen [96, 109]. Gerade auch im Falle des CD44 ist also jede Tumorentität separat zu untersuchen und zu bewerten.

Allerdings zeigte auch in Mammakarzinomen [67] und Nierenzellkarzinomen [269] eine Änderung des Expressionsverhaltens des Produkts des varianten Exons V9 einen Einfluß auf den Differenzierungsgrad der Tumoren. In dieser Untersuchung waren die einzelnen Tumoren, bei denen die Expression der Exons V4, V5 und V6 vermindert war, ausnahmslos gering differenziert. Eine statistische Signifikanz ergab sich bei der geringen Fallzahl allerdings nicht. Dagegen resultierte zwischen der Expression des varianten Exons V9 und dem Tumor-Grading eine statistisch signifikante Korrelation: Die Expression war in geringer differenzierten Tumoren signifikant häufiger vermindert als in höher differenzierten Tumoren (Abb. 68). Das CD44v7 zeigte dagegen keinen Einfluß auf das Tumor-Grading.

Zwischen Primärtumoren und zugehörigen Lymphknotenmetastasen ergaben sich in dieser Untersuchung nur in wenigen Fällen Unterschiede im Expressionsverhalten verschiedener CD44-Isoformen. Ein eindeutiger Trend in der Änderung des Expressionsverhaltens während des Metastasierungsprozesses war ebenfalls nicht erkennbar. Dieses Ergebnis und die fehlende Korrelation zwischen dem Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung der primären Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Oropharynx pN und der Expressionsminderung der verschiedenen CD44-Isoformen lassen einen vermuteten Einfluß der CD44-Expression auf die Metastasierungsneigung dieser Tumoren vermissen. Auch hier ergeben sich somit Differenzen [121, 135, 258, 302], aber auch Übereinstimmungen zu anderen Tumorentitäten [75]. Insbesondere ist wohl zwischen Tumoren zu unterscheiden, die bevorzugt hämatogen, und denen, die bevorzugt lymphogen metastasieren, da beiden Metastasierungsformen teilweise verschiedene Mechanismen zugrunde liegen [55, 289]. So spielen physikalische Kräfte in Lymphgefäßen keine wesentliche Rolle. Eine passive Metastasierung durch Embolisation von Kapillaren kommt

nur bei hämatogener Metastasierung vor. Im Verlauf dieser beiden Metastasierungsvorgänge könnte folglich unterschiedlichen Faktoren eine entscheidende Bedeutung zukommen. In dieser Untersuchung stand der Vorgang der lymphogenen Metastasierung im Vordergrund; denn zum einen bilden Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Oropharynx hämatogene Fernmetastasen erst sehr spät im Verlauf der Tumorprogression aus, zum anderen wurden in dieser Studie nur Patienten mit Tumoren ohne Fernmetastasen (M0) untersucht, da in der Regel nur bei diesen eine kurativ intendierte chirurgische Therapie erfolgversprechend ist.

Literaturverzeichnis

1. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; **281**: 1322-6.
2. Ahomadegbe JC, Barrois M, Fogel S, LeBihan ML, Douc-Rasy S, Duvillard P, Armand JP, Riou G. High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumors and metastases; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early non-invasive lesions. *Oncogene* 1995; **10**: 1217-27.
3. Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 1993; **170**: 1-8.
4. Arnold A, Kim HG, Gaz RD, Eddy RL, Fukushima Y, Byers MG, Shows TB, Kronenberg HM. Molecular cloning and chromosomal mapping of DNA rearranged with the parathyroid hormone gene in a parathyroid adenoma. *J Clin Invest* 1989; **83**: 2034-40.
5. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, Vogt M, Müller C, Dopfer K, Schneiderbanger K, Schmidt M, Löhrs U. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 1996; **77**: 255-64.
6. Baretton G, Xun L, Stoll C, Fischer-Brandies E, Schmidt M, Löhrs U. Prognostic significance of DNA ploidy in oral squamous cell carcinomas. A retrospective flow and image cytometric study with comparison of DNA ploidy in excisional biopsy specimens and resection specimens, primary tumors, and lymph node metastases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; **79**: 68-76.
7. Barak Y, Gottlieb E, Juven-Gershon T, Oren M. Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev* 1994; **8**: 1739-49.
8. Barlogie B. Abnormal cellular DNA content as a marker of neoplasia. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984; **20**: 1123-5.
9. Barten M, Ostwald C, Müller P, Löning T, Milde-Langosch K, Wukasch Y. P53 Alterationen und HPV Status in oralen Plattenepithelkarzinomen. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1994; **78**: 255-9.
10. Bartolazzi A, Nocks A, Aruffo A, Spring F, Stamenkovic I. Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluronan. *J Cell Biol* 1996; **132**: 1199-208.
11. Battifora H. P53 immunohistochemistry: A word of caution. *Hum Pathol* 1994; **25**: 435-7.
12. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Höfler H. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 1994; **54**: 3845-52.
13. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Huang HH, Nekarda H, Siewert JR, Höfler H. Exon skipping in the E-cadherin gene transcript in metastatic human gastric carcinoma. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 803-4.
14. Becker KF, Höfler H. Frequent somatic allelic inactivation of the E-cadherin gene in gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1995; **87**: 1082-4.
15. Becker N. Zeitlicher Trend der Fallzahlen und standardisierte Mortalitätsraten (ICD 140-149). http://www.dkfz-heidelberg.de/epi/Home_d/Programm/AG/Praevent/Krebshom/main/deutsch/frame5.htm, 1999.
16. Benedict WF, Xu HJ, Hu SX, Takahashi R. Role of the retinoblastoma gene in the initiation and progression of human cancer. *J Clin Invest* 1990; **85**: 988-93.

17. Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E, Brents LA, Kirby SL, Kuehl WM. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 13931-6.
18. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, Van Roy F. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J* 1995; 14: 6107-15.
19. Bier J. Definition zum radikalchirurgischen Vorgehen bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 1982; 6: 369-72.
20. Bier J. Tumoren im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich. In: Horch HH, Hrsg. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie II, Praxis der Zahnheilkunde 10/II*, 2. Auflage. München: Urban & Schwarzenberg, 1991, 267-359.
21. Birch M, Mitchell S, Hart IR. Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. *Cancer Res* 1991; 51: 6660-7.
22. Birchall MA, Schock E, Harmon BV, Gobe G. Apoptosis, mitosis, PCNA and bcl-2 in normal, leukoplakic and malignant epithelia of the human oral cavity: prospective, in vivo study. *Oral Oncol* 1997; 33: 419-25.
23. Birchmeier W, Hulsken J, Behrens J. E-cadherin as an invasion suppressor. *Ciba Found Symp* 1995; 189: 124-36.
24. Blanquet V, Turleau C, Gross-Morand MS, Senamaud-Beaufort C, Doz F, Besmond C. Spectrum of germline mutations in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma. *Hum Molec Genet* 1995; 4: 383-8.
25. Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 1998; 391: 597-601.
26. Brown TA, Bouchard T, St John T, Wayner E, Carter WG. Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol* 1991; 113: 207-21.
27. Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 1989; 58: 1097-105.
28. Buhring HJ, Müller T, Herbst R, Cole S, Rappold I, Schüller W, Zhu X, Fritzsche U, Faul C, Armeanu S, Ullrich A, Klein G, Schmidt H. The adhesion molecule E-cadherin and a surface antigen recognized by the antibody 9C4 are selectively expressed on erythroid cells of defined maturational stages. *Leukemia* 1996; 10: 106-16.
29. Bundesministerium für Gesundheit. Internationale Klassifikation der Krankheiten, Verletzungen und Todesursachen (ICD), 9. Revision, 2. Auflage. Köln: Kohlhammer, 1993.
30. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497-501.
31. Burns JE, Baird MC, Clark LJ, Burns PA, Edington K, Chapman C, Mitchell R, Robertson G, Soutar D, Parkinson EK. Gene mutations and increased levels of p53 protein in human squamous cell carcinomas and their cell lines. *Br J Cancer* 1993; 67: 1274-84.
32. Cairns J, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eby Y, Tokino K, van der Riet P, Blaugrund JE, Sidransky D. Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* 1994; 265: 415-7.
33. Calzolari A, Chiarelli I, Bianchi S, Messerini L, Gallo O, Porfirio B, Mattiuz PL. Immunohistochemical vs molecular biology methods. Complementary techniques for effective screening of p53 alterations in head and neck cancer. *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 7-11.

34. Candidus S, Bischoff P, Becker KF, Höfler H. No evidence for mutations in the alpha- and beta-catenin genes in human gastric and breast carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56: 49-52.
35. Chandler D, El-Naggar AK, Brisbay S, Redline RW, McDonnell TJ. Apoptosis and expression of the bcl-2 proto-oncogene in the fetal and adult human kidney: evidence for the contribution of bcl-2 expression to renal cancerogenesis. *Hum Pathol* 1994; 25: 789-96.
36. Chen PL, Scully P, Shew JY, Wang JY, Lee WH. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989; 58: 1193-8.
37. Chesi M, Nardini E, Brents LA, Schrock E, Ried T, Kuehl WM, Bergsagel PL. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genet* 1997; 16: 260-4.
38. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; 265: 346-55.
39. Cianfriglia F, Di Gregorio DA, Manieri A. Multiple primary tumours in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999; 35: 157-63.
40. Cleton-Jansen AM, Moerland EW, Kuipers-Dijkshoorn NJ, Callen DF, Sutherland GR, Hansen B, Devilee P, Cornelisse CJ. At least two different regions are involved in allelic imbalance on chromosome arm 16q in breast cancer. *Genes Chromosom Cancer* 1994; 9: 101-7.
41. Combaret V, Lasset C, Frappaz D, Bouvier R, Thiesse P, Rebillard AC, Philip T, Favrot MC. Evaluation of CD44 prognostic value in neuroblastoma: comparison with the other prognostic factors. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 545-9.
42. Connolly MJ, Payne RH, Johnson G, Gallie BL, Alderdice PW, Marshall WH, Lawton RD. Familial, EsD-linked, retinoblastoma with reduced penetrance and variable expressivity. *Hum Genet* 1983; 65: 122-4.
43. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 219-29.
44. Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators. *Am J Pathol* 1995; 147: 545-60.
45. Cox DR. Regression models and life-tables (with discussion). *J Roy Stat Soc* 1972; 34: 187-220.
46. Culty M, Nguyen HA, Underhill CB. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol* 1992; 116: 1055-62.
47. Dall P, Heider KH, Sinn HP, Skroch-Angel P, Adolf G, Kaufmann M, Herrlich P, Ponta H. Comparison of immunohistochemistry and RT-PCR for detection of CD44v-expression, a new prognostic factor in human breast cancer. *Int J Cancer* 1995; 60: 471-7.
48. Dazard JE, Augias D, Neel H, Mils V, Marechal V, Basset-Seguin N, Piette J. MDM-2 protein is expressed in different layers of normal human skin. *Oncogene* 1997; 14: 1123-8.
49. DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988; 54: 275-83.
50. DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnica-Worms H, Huang CM, Livingston DM. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 1989; 58: 1085-95.

51. DePinho RA. The cancer-chromatin connection. *Nature* 1998; 391: 533-6.
52. Dianzani U, Malavasi F. Lymphocyte adhesion to endothelium. *Crit Rev Immunol* 1995; 15: 167-200.
53. Doglioni C, Dei-Tos AP, Laurino L, Chiarelli C, Barbareschi M, Viale G. The prevalence of Bcl-2-immunoreactivity in breast carcinomas and its clinicopathological correlates, with particular reference to oestrogen receptor status. *Virchows Arch* 1994; 424: 47-51.
54. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; 356: 215-21.
55. Dorudi S, Hart IR. Mechanisms underlying invasion and metastasis. *Curr Opin Oncol* 1993; 5: 130-5.
56. Drenning SD, Marcovitch AJ, Johnson DE, Melhem MF, Twardy DJ, Grandis JR. Bcl-2 but not Bax expression is associated with apoptosis in normal and transformed squamous epithelium. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2913-21.
57. Dyson H, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243: 934-7.
58. Eisterer W, Hilbe W, Stauder R, Bechter O, Fend F, Thaler J. An aggressive subtype of B-CLL is characterized by strong CD44 expression and lack of CD11c. *Br J Haematol* 1996; 93: 661-9.
59. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer E, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
60. El-Deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M, Hill DE, Healy E, Rees JL, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B. Topological control of p21/WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995; 55: 2910-9.
61. Eng C, Ponder BA. The role of gene mutations in the genesis of familial cancer. *FASEB J* 1993; 7: 910-9.
62. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-22.
63. Fakhrazadeh SS, Trusko SP, George DL. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* 1991; 10: 1565-9.
64. Field JK, Pavelic ZP, Spandidos DA, Stambrook PJ, Jones AS, Gluckman JL. The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 119: 1118-22.
65. Field JK, Spandidos DA, Malliri A, Gosney JR, Yiagnisis M, Stell PM. Elevated p53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 1991; 64: 573-7.
66. Freeman RS, Donoghue DJ. Protein kinases and protooncogenes: biochemical regulators of the eukaryotic cell cycle. *Biochemistry* 1991; 30: 2293-302.
67. Friedrichs K, Franke F, Lisboa BW, Kugler G, Gille I, Terpe HJ, Hölzel F, Maass H, Günthert U. CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5424-33.
68. Friend SH, Horowitz JM, Gerber MR, Wang XF, Bogenmann E, Li FP, Weinberg RA. Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 9059-63.

69. Frixen UH, Nagamine Y. Stimulation of urokinase-type plasminogen activator expression by blockage of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion. *Cancer Res* 1993; 53: 3618-23.
70. Fröhlich M. Epidemiologie der Lippen- und Mundschleimhautkarzinome. *Med aktuell* 1991; 17: 180-1.
71. Gapany M, Pavelic ZP, Gapany SR, Pavelic L, Li Y, Craven JM, Jones H, Biddinger P, Stambrook PJ, Gluckman JL. Relationship between immunohistochemically detectable p53 protein and prognostic factors in head and neck tumors. *Cancer Detect Prev* 1993; 17: 379-86.
72. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
73. Gehan EH. A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily singly-censored samples. *Biometrika* 1965; 52: 203-23.
74. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.
75. Givchian M, Woerner SM, Lacroix J, Zöller M, Drings P, Becker H, Kayser K, Ridder R, von Knebel-Doeberitz M. Expression of CD44 splice variants in normal respiratory epithelium and bronchial carcinomas: no evidence for altered CD44 splicing in metastasis. *Oncogene* 1996; 12: 1137-44.
76. Goodman LA, Kruskal WH. Measures of association for cross-classifications. *J Am Statist Assoc* 1954; 49: 732-64.
77. Gorgoulis VG, Rassidakis GZ, Karameris AM, Papastamatiou H, Trigidou R, Veslemes M, Rassidakis AN, Kittas C. Immunohistochemical and molecular evaluation of the mdm-2 gene product in bronchogenic carcinoma. *Mod Pathol* 1996; 9: 544-54.
78. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 5195-9.
79. Grand RJ, Lecane PS, Owen D, Grant ML, Roberts S, Levine AJ, Gallimore PH. The high levels of p53 present in adenovirus early region 1-transformed human cells do not cause up-regulation of MDM2 expression. *Virology* 1995; 210: 323-34.
80. Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998; 94: 695-8.
81. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-12.
82. Greenblatt MS, Benett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
83. Grimm G. Geschwülste im Mund- und Kieferbereich. In: Schwenzer N, Grimm G, Hrsg. Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde, Spezielle Chirurgie, Band 2, 2. Auflage. Stuttgart: Thieme, 1990, 253-357.
84. Günthert U. CD44: a multitude of isoforms with diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 1993; 184: 47-63.
85. Günthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zöller M, Haussmann I, Matzkus S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65: 13-24.
86. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; 84: 345-57.
87. Hall PA, Lane DP. P53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? - revisited. *J Pathol* 1994; 172: 1-4.

88. Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 1999; **98**: 859-69.
89. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 1992; **6**: 861-70.
90. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 cdk-interacting protein cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; **75**: 805-16.
91. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New Engl J Med* 1993; **329**: 1318-27.
92. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; **266**: 1821-8.
93. Hashimoto M, Niwa O, Nitta Y, Takeichi M, Yokoro K. Unstable expression of E-Cadherin adhesion molecules in metastatic ovarian tumor cells. *Jpn J Cancer Res* 1989; **80**: 459-63.
94. Hatta K, Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol* 1988; **106**: 873-81.
95. Hazan RB, Norton L. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998; **273**: 9078-84.
96. Herold-Mende C, Seiter S, Born AI, Patzelt E, Schupp M, Zöller J, Bosch FX, Zöller M. Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Pathol* 1996; **179**: 66-73.
97. Hockenberry D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; **348**: 334-6.
98. Hockenberry DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 6961-5.
99. Hofmann M, Rudy W, Zöller M, Tolg C, Ponta H, Herrlich P, Günthert U. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 1991; **51**: 5292-7.
100. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991; **253**: 49-53.
101. Hong FD, Huang HJ, To H, Young LJ, Oro A, Bookstein R, Lee EY, Lee WH. Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 5502-6.
102. Honn KV, Tang DG. Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. *Cancer Metast Rev* 1992; **11**: 353-75.
103. Horowitz JM, Park SH, Yandell DW, Weinberg RA. Involvement of the retinoblastoma gene in the genesis of various human tumors. In: Kavenee W, Hastie N, Stanbridge E, eds. *Recessive oncogenes and tumor suppression: current communications in molecular biology*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 101-8.
104. Howes KA, Ransom N, Papermaster DS, Lasudry JG, Albert DM, Windle JJ. Apoptosis or retinoblastoma: alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presence or absence of p53. *Genes Dev* 1994; **8**: 1300-10.
105. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 3668-72.
106. Hsu YT, Youle RJ. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 1998; **273**: 10777-83.

107. Huang LC, Clarkin KC, Wahl GM. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 4827-32.
108. Hudson DL, Sleeman J, Watt FM. CD44 is the major peanut lectin-binding glycoprotein of human epidermal keratinocytes and plays a role in intercellular adhesion. *J Cell Sci* 1995; 108: 1959-70.
109. Hudson DL, Speight PM, Watt FM. Altered expression of CD44 isoforms in squamous cell carcinomas and cell lines derived from them. *Int J Cancer* 1996; 66: 457-63.
110. Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-Cadherin and APC compete for the interaction with β -catenin and cytoskeleton. *J Cell Biol* 1994; 125: 2061-9.
111. Ihara T, Yamamoto T, Sugamata M, Okumura H, Ueno Y. The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Arch* 1998; 433: 443-7.
112. Imhof BA, Vollmers HP, Goodman SL, Birchmeier W. Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell* 1983; 35: 667-75.
113. Isacke CM. The role of cytoplasmic domain in regulating CD44 function. *J Cell Science* 1994; 107: 2353-9.
114. Jalkanen S, Jalkanen M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 1992; 116: 817-25.
115. Jansen LA, Mesnil M, Jongen WM. Inhibition of gap junctional intercellular communication and delocalization of the cell adhesion molecule E-cadherin by tumor promoters. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1527-31.
116. Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 1995; 267: 1498-502.
117. Jensen PJ, Wheelock MJ. Regulation of urokinase plasminogen activator localization in keratinocytes by calcium ion and E-cadherin. *Exp Cell Res* 1992; 202: 190-8.
118. Jiang WG. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J Surg* 1996; 83: 437-46.
119. Jordan RC, Catzavelos GC, Barrett AW, Speight PM. Differential expression of bcl-2 and bax in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1996; 32B: 394-400.
120. Kadowaki T, Shiozaki H, Inoue M, Tamura S, Oka H, Doki Y, Iihara K, Matsui S, Iwazawa T, Nagafuchi A. E-cadherin and alpha-catenin expression in human esophageal cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 291-6.
121. Kainz C, Tempfer C, Kohlberger P, Janisch S, Koelbl H, Gitsch G, Breitenacker G. Immunohistochemical detection of adhesion molecule CD44 splice variants in lymph node metastases of cervical cancer. *Int J Cancer* 1996; 69: 170-3.
122. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-40.
123. Kanai Y, Oda T, Tsuda H, Ochiai A, Hirohashi S. Point mutation of the E-cadherin gene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 1035-9.
124. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Statist Assoc* 1958; 53: 457-81.
125. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304-11.
126. Katayama M, Hirai S, Kamihagi K, Nakagawa K, Yasumoto M, Kato I. Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. *Br J Cancer* 1994; 69: 580-5.

127. Katayama M, Hirai S, Yasumoto M, Kato I. Soluble fragments of E-cadherin cell adhesion molecule increase in urinary excretion of cancer patients, potentially indicating its shedding from epithelial tumor cells. *Int J Oncol* 1994; 5: 1049-57.
128. Kaufmann M, Heider KH, Sinn HP, von Minckwitz G, Ponta H, Herrlich P. CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet* 1995; 345: 615-9.
129. Kelekar A, Thompson CB. Bcl-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 324-30.
130. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-26.
131. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
132. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 820-3.
133. Ko LJ, Prives C. P53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996; 10: 1054-72.
134. Koh JY, Cho NP, Kong G, Lee JD, Yoon K. P53 mutations and human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma: correlation with apoptosis. *Br J Cancer* 1998; 78: 354-9.
135. Korabiowska M, Brinck U, Honig J, Mora O, Bartkowski S, Schauer A. CD44: a marker of metastases of head and neck melanomas. *In Vivo* 1995; 9: 253-6.
136. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-86.
137. Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* 1986; 45: 219-28.
138. Krüger E. Lehrbuch der chirurgischen Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Band 2, 7. Auflage. Berlin: Quintessenz, 1993, 379-598.
139. Kruskal WH, Wallis WA. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Statist Assoc* 1952; 47: 583-621.
140. Kugelman LC, Ganguly S, Haggerty JG, Weissman SM, Milstone LM. The core protein of epican, a heparan sulfate proteoglycan on keratinocytes, is an alternative form of CD44. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 381-5.
141. Kunishi M, Kayada Y, Yoshiga K. Down-regulated expression of CD44 variant 6 in oral squamous cell carcinomas and its relationship to regional lymph node metastasis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997; 26: 280-3.
142. Kuwashima Y, Uehara T, Kishi K, Shiromizu K, Matsuzawa M, Takayama S. Immunohistochemical characterization of undifferentiated carcinomas of the ovary. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120: 672-7.
143. Lane DP. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
144. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-3.
145. Langdon JD, Partridge M. Expression of the tumour suppressor gene p53 in oral cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1992; 30: 214-20.
146. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronon. *FASEB J* 1992; 6: 2397-404.
147. Lauwers GY, Scott GV, Karpeh MS. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas. *Cancer* 1995; 75: 2209-13.
148. Lavieille JP, Brambilla E, Riva-Lavieille C, Reyt E, Charachon R, Brambilla C. Immunohistochemical detection of p53 protein in preneoplastic lesions and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otolaryngol Stockh* 1995; 115: 334-9.

149. Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 1987; 235: 1394-9.
150. Lesley J, English N, Perschl A, Gregoroff J, Hyman R. Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation. *J Exp Med* 1995; 182: 431-7.
151. Lesley J, He Q, Miyake K, Hamann A, Hyman R, Kincade PW. Requirements for hyaluronic acid binding by CD44: a role for the cytoplasmic domain and activation by antibody. *J Exp Med* 1992; 175: 257-66.
152. Lesley J, Howes N, Perschl A, Hyman R. Hyaluronan binding function of CD44 is transiently activated on T cells during an in vivo immune response. *J Exp Med* 1994; 180: 383-7.
153. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 1993; 54: 271-335.
154. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
155. Li FP, Fraumeni JF. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1969; 43: 1365-73.
156. Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol (Suppl)* 1992; 97: 4-13.
157. Little M, Wainwright B. Methylation and p16: suppressing the suppressor. *Nature Med* 1995; 1: 633-4.
158. Lohmann DR, Gerick M, Brandt B, Oelschlager U, Lorenz B, Passarge E, Horsthemke B. Constitutional RB1-gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 282-94.
159. Luo RX, Postigo AA, Dean DC. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 1998; 92: 463-73.
160. Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H, Günthert U. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* 1994; 124: 71-82.
161. Magnaghi-Jaulin L, Groisman R, Naguibneva I, Robin P, Lorain S, Le-Villain JP, Troalen F, Trouche D, Harel-Bellan A. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* 1998; 391: 601-5.
162. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250: 1233-8.
163. Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Statist* 1947; 18: 50-60.
164. Mantel N. Ranking procedures for arbitrarily restricted observations. *Biometrics* 1967; 23: 65-78.
165. Mareel M, Behrens J, Birchmeier W, De Bruyne GK, Vlemminckx K, Hoogewijw A. Down-regulation of E-cadherin in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells inside tumors of nude mice. *Int J Cancer* 1991; 47: 922-8.
166. Mareel M, Bracke M, van Roy F. Cancer metastasis: negative regulation by an invasion-suppressor complex. *Cancer Detect Prev* 1995; 19: 451-64.
167. Matsui S, Shiozaki H, Inoue M, Tamura S, Doki Y, Kadowaki T, Iwazawa T, Shimaya K, Nagafuchi A, Tsukita S. Immunohistochemical evaluation of alpha-catenin expression in human gastric cancer. *Virchows Arch* 1994; 424: 375-81.

168. Matsumura T, Yoshihama Y, Kimura T, Shintani S, Alcalde RE. P53 and MDM2 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncology* 1996; 53: 308-12.
169. Matsuta M, Kon S, Sasaki K, Matsuta M. Immunohistochemical detection of p21WAF1/CIP1 and p53 proteins in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections of squamous cell carcinoma of the skin. *J Dermatol Sci* 1997; 14: 233-9.
170. Mayer B, Jauch KW, Günthert U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke I, Johnson JP. De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 1993; 342: 1019-22.
171. McDonnell TJ, Nunez G, Platt FM, Hockenberry D, London L, McKearn JP, Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 1901-7.
172. Merkel DE, McGuire WL. Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer* 1990; 65: 1194-205.
173. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5-prime CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Med* 1995; 1: 686-92.
174. Metelmann HR. Tumoren im Kopf-Halsbereich. In: Horch HH, Hrsg. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie II, Praxis der Zahnheilkunde 10/II*, 3. Auflage. München: Urban & Schwarzenberg, 1998, 249-328.
175. Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 1994; 54: 3391-5.
176. Milstone LM, Hough-Monroe L, Kugelman LC, Bender JR, Haggerty JG. Epican, a heparan/chondroitin sulfate proteoglycan form of CD44, mediates cell-cell adhesion. *J Cell Sci* 1994; 107: 3183-90.
177. Min BM, Baek JH, Shin KH, Gujuluva CN, Cherrick HM, Park NH. Inactivation of the p53 gene by either mutation or HPV infection is extremely frequent in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994; 30: 338-45.
178. Mitchell EL, White GR, Santibanez-Koref MF, Varley JM, Heighway J. Mapping of gene loci in the q13-q15 region of chromosome 12. *Chromosome Res* 1995; 3: 261-2.
179. Mittermayer C. *Oralpathologie*, 3. Auflage. Stuttgart: Schattauer, 1993, 80-110.
180. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293-9.
181. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm2-oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; 69: 1237-45.
182. Morgenbesser SD, Williams BO, Jacks T, DePinho RA. P53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* 1994; 371: 72-4.
183. Munro SB, Turner IM, Farookhi R, Blaschuk OW, Jothy S. E-cadherin and OB-cadherin mRNA levels in normal human colon and colon carcinoma. *Exp Mol Pathol* 1995; 62: 118-22.
184. Nagafuchi A, Takeichi M, Tsukita S. The 102 kD cadherin-associated protein: similarity to vinculin and post-transcriptional regulation of expression. *Cell* 1991; 65: 849-57.
185. Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 1996; 380: 360-4.
186. Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: Structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997; 71: 241-319.
187. Neame SJ, Isacke CM. Phosphorylation of CD44 in vivo requires both Ser 323 and Ser 325, but does not regulate membrane localization or cytoskeletal interaction in epithelial cells. *EMBO J* 1992; 11: 4733-8.

188. Nees M, Homann N, Discher H, Andl T, Enders C, Herold-Mende C, Schuhmann A, Bosch FX. Expression of mutated p53 occurs in tumor-distant epithelia of head and neck cancer patients: a possible molecular basis for the development of multiple tumors. *Cancer Res* 1993; 53: 4189-96.
189. Neumann HG. Entstehung und Behandlung von Tumoren. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K, Hrsg. *Pharmakologie und Toxikologie*, 6. Auflage. Mannheim: Wissenschaftsverlag, 1992, 722-46.
190. Newton K, Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 68-75.
191. Nishioka H, Hiasa Y, Hayashi I, Kitahori Y, Konishi N, Sugimura M. Immunohistochemical detection of p53 oncoprotein in human oral squamous cell carcinomas and leukoplakias: comparison with proliferating cell nuclear antigen staining and correlation with clinicopathological findings. *Oncology* 1993; 50: 426-9.
192. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368: 753-6.
193. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 1994; 211: 90-8.
194. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-8.
195. Nurse P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 1994; 79: 547-50.
196. Nylander K, Nilsson P, Mehle C, Roos G. P53 mutations, protein expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 1995; 71: 826-30.
197. Nylander K, Schildt EB, Eriksson M, Roos G. PCNA, Ki-67, p53, bcl-2 and prognosis in intraoral squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anal Cell Pathol* 1998; 14: 101-10.
198. Oliner JD, Kinzler KW, Metzler PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358: 80-3.
199. Oliveira DT, Odell EW. Expression of CD44 variant exons by normal oral epithelia. *Oral Oncol* 1997; 33: 260-2.
200. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-19.
201. Oren M. The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11: 141-8.
202. Patel DD, Hale LP, Whichard LP, Radcliff G, Mackay CR, Haynes BF. Expression of CD44 molecules and CD44 ligands during human thymic fetal development: expression of CD44 isoforms is developmentally regulated. *Int Immunol* 1995; 7: 277-86.
203. Pavletich NP, Chambers KA, Pabo CO. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hotspots. *Genes Dev* 1993; 7: 2556-64.
204. Peach RJ, Hollenbaugh D, Stamenkovic I, Aruffo A. Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J Cell Biol* 1993; 122: 257-64.
205. Pena JC, Thompson CB, Recant W, Vokes EE, Rudin CM. Bcl-xL and Bcl-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1999; 85: 164-70.
206. Pezzella F, Tse AG, Cordell JL, Pulford KA, Gatter KC, Mason DY. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990; 137: 225-32.
207. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, Harris A, Gatter KC, Mason DY. Bcl-2 protein in non-small lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 690-4.

208. Piffko J, Bankfalvi A, Öfner D, Joos U, Böcker W, Schmid KW. Immunohistochemical detection of p53 protein in archival tissues from squamous cell carcinomas of the oral cavity using wet autoclave antigen retrieval. *J Pathol* 1995; 176: 69-75.
209. Pilotti S, Collini P, Del Bo R, Cattoretti G, Pierotti MA, Rilke F. A novel panel of antibodies that segregates immunocytochemically poorly differentiated carcinoma from undifferentiated carcinoma of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 1054-64.
210. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa, 2nd edition. Berlin: Springer, 1997.
211. Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Luminari S, Capaccio P, Neri A, Buffa R. MDM-2 oncoprotein overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma: association with wild-type p53 accumulation. *Mod Pathol* 1997; 10: 785-92.
212. Quelle DE, Cheng M, Ashmun RA, Sherr CJ. Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16(INK4a) but not by the alternative reading frame protein p19(ARF). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 669-73.
213. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995; 83: 993-1000.
214. Raycroft L, Wu H, Lozano G. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* 1990; 249: 1049-51.
215. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1-6.
216. Reisman D, Greenberg M, Rotter V. Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within exon 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 5146-50.
217. Robert Koch-Institut. Geschätzte Zahl jährlich neu an Krebs Erkrankter, Deutschland 1997. <http://www.rki.de/GBE/KREBS/KREBS.HTM>, 1999.
218. Rosenberg CL, Kim HG, Shows TB, Kronenberg HM, Arnold A. Rearrangement and overexpression of D11S287E, a candidate oncogene on chromosome 11q13 in benign parathyroid tumors. *Oncogene* 1991; 6: 449-53.
219. Roy PH, Bears SO. Spinal accessory nerve in radical neck dissections. *Am J Surg* 1969; 118: 800-4.
220. Rubinfeld B, Souza B, Albert B, Müller I, Chamberlain O, Masiarz SC. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 1993; 262: 1731-4.
221. Salmi M, Grön-Virta K, Sointu P, Grenman R, Kalimo H, Jalkanen S. Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: downregulation during malignant transformation of tumours of squamocellular origin. *J Cell Biol* 1993; 122: 431-42.
222. Sarnow P, Ho YS, Williams J, Levine AJ. Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 1982; 28: 387-94.
223. Sauter ER, Cleveland D, Trock B, Ridge JA, Klein-Szanto AJ. P53 is overexpressed in fifty percent of pre-invasive lesions of head and neck epithelium. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2269-74.
224. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-36.
225. Schmitz-Moormann P, Gebert G, Thomas C. Allgemeine Pathologie. Stuttgart: Schattauer, 1995, 161-209.

226. Screaton GR, Bell MV, Bell JI, Jackson DG. The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat. *J Biol Chem* 1993; 268: 12235-8.
227. Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 12160-4.
228. Seiter S, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Matzkus S, Zöller M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 1993; 177: 443-55.
229. Seiter S, Tilgen W, Herrmann K, Schadendorf D, Patzelt E, Möller P, Zöller M. Expression of CD44 splice variants in human skin and epidermal tumours. *Virchows Arch* 1996; 428: 141-9.
230. Selivanova G, Wiman KG. P53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Adv Cancer Res* 1995; 66: 143-80.
231. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704-7.
232. Shapiro SS, Wilk MB, Chen HJ. A comparative study of various tests of normality. *J Am Statist Assoc* 1968; 63: 1343-72.
233. Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Zeev A, Rotter V. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 6565-77.
234. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; 79: 551-5.
235. Sherrington PD, Forster A, Seawright A, van Heyningen V, Rabbitts TH. Human RAG2, like RAG1, is on chromosome 11 band p13 and therefore not linked to ataxia telangiectasia complementation groups. *Genes Chromosom Cancer* 1992; 5: 404-6.
236. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997; 91: 325-34.
237. Shimazui T, Girolodi LA, Bringuier PP, Oosterwijk E, Schalken JA. Complex cadherin expression in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 3234-7.
238. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399: 483-7.
239. Shin DM, Kim J, Ro JY, Hittelman J, Roth JA, Hong WK, Hittelman WN. Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 321-6.
240. Shintani S, Yoshihama Y, Emilio AR, Matsumura T. Overexpression of p53 is an early event in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 1995; 15: 305-8.
241. Shiozaki H, Kadowaki T, Doki Y, Inoue M, Tamura S, Oka H, Iwazawa T, Matsui S, Shimaya K, Takeichi M. Effect of epidermal growth factor on cadherin-mediated adhesion in a human oesophageal cancer cell line. *Br J Cancer* 1995; 71: 250-8.
242. Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* 1996; 77: 1605-13.
243. Singh BB, Chandler FW, Whitaker SB, Forbes-Nelson AE. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 692-8.
244. Sliutz G, Tempfer C, Winkler S, Kohlberger P, Reinthaller A, Kainz C. Immunohistochemical and serological evaluation of CD44 splice variants in human ovarian cancer. *Br J Cancer* 1995; 72: 1494-7.

245. Sobin LH, Wittekind C, eds. TNM classification of malignant tumours, 5th edition. New York: Wiley-Liss, 1997; 17-32.
246. Soukka T, Salmi M, Joensuu H, Hakkinen L, Sointu P, Koulou L, Kalimo K, Klemi P, Grenman R, Jalkanen S. Regulation of CD44v6-containing isoforms during proliferation of normal and malignant epithelial cells. *Cancer Res* 1997; 57: 2281-9.
247. Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122: 627-32.
248. Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J* 1991; 10: 343-8.
249. Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 1999 für die Bundesrepublik Deutschland. Stuttgart: Metzler-Poeschel, 1999, 424-7.
250. Stauder R, Eisterer W, Thaler J, Günthert U. CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood* 1995; 85: 2885-99.
251. Stenger JE, Mayr GA, Mann K, Tegtmeyer P. Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers. *Mol Carcinog* 1992; 5: 102-6.
252. Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1286-96.
253. Stoll C, Baretton G, Ahrens C, Löhrs U. Prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2000; 436: 102-8.
254. Stoll C, Baretton G, Löhrs U. The influence of p53 and associated factors on the outcome of patients with oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 1998; 433: 427-33.
255. Stoll C, Baretton G, Soost F, Domide P, Terpe HJ, Löhrs U. Prognostic importance of the expression of CD44 splice variants in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1999; 35: 484-9.
256. Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Voudsen KH, Peters G. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 1998; 17: 5001-14.
257. Strachan DS. Histology of the oral mucosa and tonsils. In: Avery JK, Steele PF, eds. *Oral development and histology*, 2. ed. New York: Thieme, 1994: 298-320.
258. Streit M, Schmidt R, Hilgenfeld RU, Thiel E, Kreuser ED. Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. *J Mol Med* 1996; 74: 253-68.
259. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 1993; 262: 1734-7.
260. Taher TE, Smit L, Griffioen AW, Schilder-Tol EJ, Borst J, Pals ST. Signaling through CD44 is mediated by tyrosine kinases. Association with p56lck in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1996; 271: 2863-7.
261. Takayama T, Shiozaki H, Inoue M, Tamura S, Oka H, Kadowaki T, Takatsuka Y, Nagafuchi A, Tsukita S, Mori T. Expression of E-cadherin and alpha-catenin molecules in human breast cancer tissue and association with clinicopathological features. *Int J Oncol* 1994; 5: 775-80.
262. Takayama T, Shiozaki H, Shibamoto S, Oka H, Kimura Y, Tamura S, Inoue M, Monden T, Ito F, Monden M. Beta-catenin expression in human cancers. *Am J Pathol* 1996; 148: 39-46.

263. Takeichi M. Functional correlation between cell adhesion properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 1977; 75: 464-74.
264. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991; 251: 1451-5.
265. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 806-11.
266. Tempfer C, Gitsch G, Haeusler G, Reinthaller A, Koelbl H, Kainz C. Prognostic value of immunohistochemically detected CD44 expression in patients with carcinoma of the vulva. *Cancer* 1996; 78: 273-7.
267. Terpe HJ, Christiansen H, Gonzalez M, Berthold F, Lampert F. Differentiation and prognosis of neuroblastoma in correlation to the expression of CD44s. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 549-52.
268. Terpe HJ, Stark H, Prehm P, Günthert U. CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelial of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry* 1994; 101: 79-89.
269. Terpe HJ, Storkel S, Zimmer U, Anquez V, Fischer C, Pantel K, Günthert U. Expression of CD44 isoforms in renal cell tumors. Positive correlation to tumor differentiation. *Am J Pathol* 1996; 148: 453-63.
270. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-6.
271. Toyama-Sorimachi N, Miyasaka M. A novel ligand for CD44 is sulfated proteoglycan. *Int Immunol* 1994; 6: 655-60.
272. Trent JM, Wiltshire R, Su LK, Nicolaides NC, Vogelstein B, Kinzler KW. The gene for the APC-binding protein beta-catenin (CTNNB1) maps to chromosome 3p22, a region frequently altered in human malignancies. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 71: 343-4.
273. Trochon V, Mabilat C, Bertrand P, Legrand Y, Smadja-Joffe F, Soria C, Delpech B, Lu H. Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer* 1996; 66: 664-8.
274. Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 5214-8.
275. Tsujimoto Y, Ikegaki N, Croce CM. Characterization of the protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Oncogene* 1987; 2: 3-7.
276. Tsukita S, Oishi K, Sato N, Kamai A. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 1994; 126: 391-401.
277. Tsukita SH, Tsukita S, Nagafuchi A, Yonemura S. Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4: 834-9.
278. Underhill C. CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Science* 1992; 103: 293-8.
279. Underhill C, Nguyen HA, Shizari M, Culty M. CD44 positive macrophages take up hyaluronan during lung development. *Dev Biol* 1993; 155: 324-36.
280. Vermeulen SJ, Bruyneel EA, van Roy FM, Mareel MM, Bracke ME. Activation of the E-cadherin/catenin complex in human MCF-7 breast cancer cells by all-trans-retinoic acid. *Br J Cancer* 1995; 72: 1447-53.
281. Vogelstein B, Kinzler KW. P53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-6.
282. Vojtěšek B, Bártek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Meth* 1992; 151: 237-44.

283. Wagner G, Hrsg. Tumorlokalisationsschlüssel, 5. Auflage. Berlin: Springer, 1993, 14-23.
284. Wang JY. Retinoblastoma protein in growth suppression and death protection. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7: 39-45.
285. Warnakulasuriya KA, Johnson NW. Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 404-8.
286. Washington K, Gottfried MR, Telen MJ. Expression of the cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1994; 25: 1043-9.
287. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81: 323-30.
288. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-9.
289. Whalen GF, Sharif SF. Locally increased metastatic efficiency as a reason for preferential metastasis of solid tumors to lymph nodes. *Ann Surg* 1992; 215: 166-71.
290. Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; 334: 124-9.
291. Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer – a review. *Oral Oncol* 1998; 34: 441-7.
292. Willis RA. The spread of tumors in the human body. London: Butterworth, 1952.
293. Wilson GD, Richman PI, Dische S, Saunders MI, Robinson B, Daley FM, Ross DA. P53 status of head and neck cancer: relation to biological characteristics and outcome of radiotherapy. *Br J Cancer* 1995; 71: 1248-52.
294. Windle JJ, Albert DM, O'Brien JM, Marcus DM, Distèche CM, Bernards R, Mellon PL. Retinoblastoma in transgenic mice. *Nature* 1990; 343: 665-9.
295. Wood MW, Medina JE, Thompson GC, Houck JR, Min KW. Accumulation of the p53 tumor-suppressor gene product in oral leukoplakia. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111: 758-63.
296. World Health Organization, Percy C, van Holten V, Muir C, eds. International classification of diseases for oncology, 2nd edition. Geneva: World Health Organization, 1990.
297. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993; 7: 1126-32.
298. Wynford-Thomas D. P53 in tumour pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 1992; 166: 329-30.
299. Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR, Livingston DM. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 1995; 375: 694-8.
300. Xie X, De Angelis P, Clausen OP, Boysen M. Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1999; 35: 502-9.
301. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. P21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-4.
302. Yamaguchi A, Urano T, Goi T, Saito M, Takeuchi K, Hirose K, Nakagawara G, Shiku H, Furukana K. Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1122-7.

303. Yandell DW, Campbell TA, Dayton SH, Petersen R, Walton D, Little JB, McConkie-Rosell A, Buckley E, Dryja T. Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counseling. *New Engl J Med* 1989; 321: 1689-95.
304. Yang B, Yang BL, Savani RC, Turley EA. Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *EMBO J* 1994; 13: 286-96.
305. Zetter BR. Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 219-29.
306. Zhang H, Xiong Y, Beach D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 897-906.
307. Zhang HS, Postigo AA, Dean DC. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16(INK4a), TGF-beta, and contact inhibition. *Cell* 1999; 97: 53-61.
308. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both Rb and p53 tumor suppressor pathways. *Cell* 1998; 92: 725-34.
309. Zhu D, Bourguignon L. Overexpression of CD44 in p185(neu)-transfected NIH3T3 cells promotes an up-regulation of hyaluronic acid-mediated membrane-cytoskeleton interaction and cell adhesion. *Oncogene* 1996; 12: 2309-14.
310. Zöller M. CD44: physiological expression of distinct isoforms as evidence for organ-specific metastasis formation. *J Mol Med* 1995; 73: 425-38.

Anmerkungen

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von Forschungsmitteln aus der Friedrich-Baur-Stiftung (RK-Nr. 82 54 008), aus dem Curt-Bohnewand-Fonds (9851 / 547 73-9), der K. L. Weigandschen Stiftung (9841 / 547 73-0) und dem Nachlaß Gravenhorst (9854 / 547 73-3) der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München finanziert.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen ärztlichen Direktoren und Lehrern, Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h. c. mult. Dieter Schlegel und Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Hans-Joachim Neumann, unter deren Leitung ich die Gelegenheit und Motivation zur Durchführung dieser Arbeiten erhielt. Herrn Prof. Dr. med. Udo Löhrs und Herrn Prof. Dr. med. Gustavo Baretton, deren persönlicher Einsatz diese Untersuchungen überhaupt erst ermöglicht hat und die sie stets engagiert und richtungsweisend gefördert haben, gilt mein besonders herzlicher Dank für die wertvolle Unterstützung und die enge, vertrauensvolle Zusammenarbeit. Zusätzlich ist die angenehme Atmosphäre während der Arbeiten zu unterstreichen, zu der auch die übrigen Mitarbeiter am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München beigetragen haben. Für ihre hervorragende technische Assistenz danke ich Frau Priska Domide und Frau Corinne Ahrens.

Lebenslauf

Name:	Christian Stoll, geb. am 23.04.1960 in Lübeck.
Eltern:	Dr. h. c. mult. Karlheinz Stoll, Bischof, geb. am 12.06.1927 in Dörfel bei Annaberg (Erzgebirge), gest. am 25.01.1992 in Lübeck; Inge Stoll, geb. Mackat, Hausfrau, geb. am 06.10.1926 in Tilsit (Ostpreußen).
Familienstand:	verheiratet seit dem 13.07.1984 mit Doris Stoll, geb. Kuhlmann, 2 Kinder (Stephanie und Christina, beide geb. am 26.12.1991).
Schulbildung:	1966-1970 Grundschule in Lübeck; 1970-1979 Gymnasium: Katharineum zu Lübeck; 23.06.1979 Abitur, Note 1,2; Großes Latinum, Graecum.
Studium:	1979-1986 Medizin: Medizinische Hochschule Hannover, 30.04.1986 Ärztliche Prüfung, 14.07.1986 Approbation als Arzt; 1982-1988 Zahnmedizin: Medizinische Hochschule Hannover, 30.09.1988 Zahnärztliche Prüfung, 08.11.1988 Approbation als Zahnarzt.
Klinische und akademische Tätigkeiten:	01.03.1988-31.01.1989 Assistenzarzt: Klinik für Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Henriettenstiftung in Hannover; 01.02.1989-30.11.1996 wissenschaftlicher Assistent: Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Ludwig- Maximilians-Universität München; seit 01.12.1996 wissenschaftlicher Mitarbeiter als Oberarzt: Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie / Plastische Operationen der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin.
Facharzt- anerkennungen:	20.10.1993 Facharzt für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Bayerische Landesärztekammer), 28.08.1995 Zusatzbezeichnung Plastische Operationen (Bayerische Landesärztekammer); 26.02.1996 Zahnarzt für Oralchirurgie (Bayerische Landeszahnärztekammer).
Promotionen:	01.07.1987 Dr. med. mit der Note „sehr gut bestanden“: Medizinische Hochschule Hannover, Thema: Serum-Antikörper gegen gemeinsame Antigene bakterieller Lipopolysaccharide bei gesunden Erwachsenen und Patienten mit multiplem Myelom, Herstellung muriner monoklonaler Antikörper gegen gemeinsame Antigene bakterieller Lipopolysaccharide; 29.10.1996 Dr. med. dent. mit der Note „magna cum laude“: Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Thema: Immunhistologische Untersuchungen zur Rolle von p53 und assoziierten Faktoren bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx.